



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/81, 1/16, C07K 14/40, 7/06, 7/08</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/14259</p> <p>(43) 国際公開日 2000年3月16日(16.03.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04802</p> <p>(22) 国際出願日 1999年9月3日(03.09.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/251526 1998年9月4日(04.09.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 麒麟麦酒株式会社 (KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒104-8288 東京都中央区新川二丁目10番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 米田俊浩(KOMEDA, Toshihiro)[JP/JP] 近藤恵二(KONDO, Keiji)[JP/JP] 〒236-0004 神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-5 麒麟麦酒株式会社 基盤技術研究所内 Kanagawa, (JP)</p> <p>(74) 代理人 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.) 〒105-0001 東京都港区虎ノ門1丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: <b>CANDIDA BOIDINII STRAINS HAVING LOWERED PROTEASE ACTIVITY AND UTILIZATION THEREOF AS HOST FOR PRODUCING FOREIGN PROTEIN</b></p> <p>(54)発明の名称 プロテアーゼ活性の低下したカンジダ・ボイジニ株及び異種タンパク質製造用宿主としてのその使用</p> <p>(57) Abstract <i>Candida boidinii</i> strains having a lowered protease activity, in particular, those having been inactivated in the proteinase A or proteinase B activity or both of these proteinase activities; a process for producing a useful foreign protein (for example, cathepsin C) by transforming such a <i>C. boidinii</i> strain with an expression vector containing a gene encoding the foreign protein; proteins having the proteinase A or proteinase B activity; DNAs encoding these proteins; and a secretory signal peptide of proteinase A derived from <i>C. boidinii</i>.</p>		

(57)要約

本発明は、プロテアーゼ活性の低下したカンジダ・ボイジニ (*Candida boidinii*) 株、特にプロテイナーゼA、プロテイナーゼB又はその両方のプロテアーゼ活性が喪失されたカンジダ・ボイジニ株、このカンジダ・ボイジニ株を、有用な異種タンパク質（例えばカテプシンC）をコードする遺伝子を含む発現ベクターで形質転換して異種タンパク質を製造する方法、プロテイナーゼA活性又はプロテイナーゼB活性を有するタンパク質、それらのタンパク質をコードするDNA、並びにカンジダ・ボイジニ由来プロテイナーゼAの分泌シグナルペプチドに関する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TD	チャド
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア		共和国	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

## 明 細 書

プロテアーゼ活性の低下したカンジダ・ボイジニ株及び  
異種タンパク質製造用宿主としてのその使用

## 発明の技術分野

本発明は、カンジダ・ボイジニ (*Candida boidinii*) のプロテアーゼ遺伝子、該プロテアーゼ遺伝子を改変したDNAを有するカンジダ・ボイジニ株、該カンジダ・ボイジニ株を宿主として用いる異種タンパク質の製造法に関する。このカンジダ・ボイジニ株を宿主とするタンパク質発現系を用いれば、目的異種タンパク質を収率よく生産することができる。

また、本発明は、カンジダ・ボイジニを宿主とする異種タンパク質の分泌発現に有用なシグナルペプチドに関し、該シグナルペプチドを利用する異種タンパク質の分泌発現系、及び該分泌発現系を用いる異種タンパク質の製造法に関する。

## 発明の背景

メタノール資化性酵母カンジダ・ボイジニは、近年、異種タンパク質発現系の有効な宿主として開発されてきた。メタノール資化経路に存在するアルコールオキシダーゼ、ジヒドロキシアセトンシンターゼ、ギ酸脱水素酵素はメタノール存在下で培養すると、著量生産され、それらの遺伝子の調節領域を用いた異種遺伝子の発現方法が研究されている（特開平5-344895号公報、国際公開第WO 97/10345号等）。しかしながら異種タンパク質を遺伝子組み換え法によって生産する場合、目的産物が宿主由来のプロテアーゼによって分解されることがある。そのような場合、目的タンパク質の生産量が減少し、またタンパク質分解産物の混入により目的タンパク質の精製が困難となる。

遺伝子組み換え法によって生産される目的タンパク質の分解の問題を回避するために、目的タンパク質を分解するプロテアーゼ活性を阻害するような培養方法が用いられてきた。例えば組換え体を培養する培地のpHを調整することにより

プロテアーゼ作用を阻害することが可能である。しかしながらこの方法はある種の異種タンパク質を発現する宿主酵母の増殖に影響を与えるであろうし、細胞外でのタンパク質の分解にのみ効果的である。

一方、酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia pastoris* においてプロテイナーゼA、プロテイナーゼBを不活性化した株をプロテアーゼ欠損株として用いることにより、菌体内及び菌体外タンパク質生産を増加させたという例が示されている（特表平6-506117号公報、Weis, H. M. ら, FEBS Lett., 377, 451 (1995)、Inoue, K. ら, Plant Cell Physiol., 38 (3), 366 (1997)）。

プロテイナーゼA及びプロテイナーゼBは液胞に局在するプロテアーゼで、それぞれ *PEP4* 遺伝子、*PRB1* 遺伝子によってコードされている。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の研究によれば、プロテイナーゼA及びプロテイナーゼBは自分自身やカルボキシペプチダーゼYなどの別のプロテアーゼを活性化する（vandenHazel, H. B. ら, YEAST, 12, 1 (1996)）。

ところで、カンジダ・ボイジニを用いて異種遺伝子を発現させる際、タンパク質生産量を高めるためにプロテアーゼ欠損株を用いることについては全く知られていなかったが、また当業者においてそのような想起を拒む以下に示すような問題点があった。

*Saccharomyces cerevisiae* や *Pichia pastoris* とカンジダ・ボイジニとは菌学的に本質的に異なっていて、多くの代謝的、生理的相違が存在する。それゆえタンパク質分解機構が異なっていることは容易に推測される。今のところカンジダ・ボイジニに存在するタンパク質分解活性についての知見は全く存在せず、本発明者らによって今回初めて、*Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia pastoris* ではプロテイナーゼA遺伝子欠損によって完全に活性を失うカルボキシペプチダーゼYが、プロテイナーゼA遺伝子を欠損したカンジダ・ボイジニにおいては約4

0%活性が残存していることが見い出されたが、この例もカンジダ・ボイジニのタンパク質分解機構が前記の他の2つの酵母のものと異なることを示すものである。

プロテアーゼ欠損株の取得は、変異株のスクリーニング、遺伝子破壊によって取得される。変異株をスクリーニングするためには膨大な数の変異株について解析しなければならない、*Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia pastoris*と異なり、胞子形成能のないカンジダ・ボイジニではかけ合せにより目的とする遺伝子だけに変異が導入されたかどうか解析することは不可能である。さらに変異した形質が変異前の状態に戻る復帰変異株も起こり得る。一方、遺伝子破壊法は目的とする遺伝子だけを欠損させることが可能であるため、有効な手法であるが、遺伝子破壊を行うために宿主の目的遺伝子領域を獲得しなければならない。しかしながら、カンジダ・ボイジニに関するこのようなプロテアーゼ及びその遺伝子に関する知見は現在まで全く得られていない。

したがって、カンジダ・ボイジニのプロテアーゼ欠損株を利用した発現系における生産性の向上について、これまで何ら検討されてこなかった。

本発明は、カンジダ・ボイジニに由来するプロテアーゼ、そのプロテアーゼをコードする塩基配列を有するDNA、及びそのプロテアーゼ遺伝子の欠失したカンジダ・ボイジニ株を提供することを目的とする。またそのプロテアーゼタンパク質に由来する分泌シグナルペプチドをコードするDNA配列を酵母分泌発現系に有用なシグナルペプチド、及びそのシグナルペプチドを利用した異種タンパク質の分泌生産方法を提供することを目的とする。

### 発明の概要

本発明者らは、メタノール資化性酵母 *Canidida boidinii* のプロテアーゼ遺伝子を解析し、異種遺伝子の効率的発現を達成すべく鋭意研究を行った結果、プロテアーゼ遺伝子欠失カンジダ・ボイジニ株を用いて異種遺伝子の高発現を達成することにより、本発明を完成するに至った。

本発明は、プロテアーゼ活性の低下したカンジダ・ボイジニ株を提供する。ここで、プロテアーゼは組換え技術での発現によって生成された異種タンパク質の分解に関与するものであるのが好ましい。その種のプロテアーゼの少なくとも1つの活性を喪失させることによって、全体的にプロテアーゼ活性を低下させることができる。

本発明の実施態様において、本発明はプロテイナーゼA、プロテイナーゼB又はその両方のプロテアーゼ活性が喪失されたカンジダ・ボイジニ株を提供する。より具体的には、そのような菌株はカンジダ・ボイジニSK740株、SK741株、SK774株又はSK775株である。

本発明はまた、上記の本カンジダ・ボイジニ株を、有用な異種タンパク質をコードする遺伝子を含む発現ベクターで形質転換し、適当な培地にて培養し、生成した異種タンパク質を回収することを含む、タンパク質の製造方法を提供する。

本発明の実施態様において、本発明には、カンジダ・ボイジニSK741株を、カテプシンCをコードする遺伝子を含む発現ベクターで形質転換し、適当な培地にて培養し、生成したカテプシンCを回収することを含む、カテプシンCの製造方法が包含される。

発現ベクターは、異種タンパク質をコードする遺伝子の5'末端に隣接して分泌シグナルペプチド配列をコードするDNAを含むことができる。シグナルペプチドはリボソームで合成された前駆体タンパク質を膜に輸送する役割を有し、シグナルペプチダーゼにより切断され、結果的に成熟タンパク質が細胞外に分泌されることになる。本発明の実施態様において、分泌シグナルペプチド配列はプロテアーゼタンパク質由来のもの、より具体的にはカンジダ・ボイジニのプロテイナーゼA由来の配列番号4に示すアミノ酸配列からなる。

本発明はさらに、配列番号2に示される23位～420位のアミノ酸配列、あるいはその配列において少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%の相同性を有するように1個以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつプロテアーゼ活性を有するカンジダ・ボイジニ株由来のプロテイナーゼA又はその誘導体を提供する。

本発明はさらにまた、上記のカンジダ・ボイジニ株由来のプロテイナーゼA又はその誘導体をコードするDNAをも提供する。

本発明はまた、配列番号2に示されるアミノ酸配列、あるいはその配列において少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%の相同性を有するように1個以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する、カンジダ・ボイジニ株由来の前駆体プロテイナーゼA又はその誘導体を提供する。

本発明はさらに、上記のカンジダ・ボイジニ株由来の前駆体プロテイナーゼA又はその誘導体をコードするDNAをも提供する。具体的には、該DNAは配列番号3に示される塩基配列を有することができる。

本発明はまた、配列番号5に示されるアミノ酸配列、あるいはその配列において少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%の相同性を有するように1個以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつプロテアーゼ活性を有するカンジダ・ボイジニ株由来のプロテイナーゼB又はその誘導体を提供する。

本発明はさらに、上記のカンジダ・ボイジニ株由来のプロテイナーゼB又はその誘導体をコードするDNAをも提供する。具体的には、該DNAは配列番号6に示される塩基配列を有する。

カンジダ・ボイジニ株のプロテイナーゼA、B又は前駆体プロテイナーゼA、B及びそれらをコードするDNAは、パン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 又はピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) のプロテイナーゼA、B及びそれらをコードするPEP4、PRB1遺伝子と配列上の類似性をもつが、そのアミノ酸及びDNA配列は*Saccharomyces cerevisiae*や*Pichia pastoris*のプロテイナーゼA及びPEP4、PRB1遺伝子とはともに80%より低い相同性を有し本質的に異なるものである。それゆえ、本発明における上記の「誘導体」は、目的とするプロテアーゼ活性が得られる限り、及び／又は、配列番号2、3又は配列番号5、6に示される配列に、それらの配列と少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%の相同性を有する限り、置換、

欠失、挿入又は付加等の変異を含み得ることを意味する。また、本発明の誘導体には、配列番号 2 又は 5 に示されるアミノ酸配列と本質的に同一のアミノ酸配列をコードする任意の塩基配列をもつ DNA や染色体上の相同遺伝子を破壊するのに十分な相同性をもつ DNA 配列も含まれる。例えば、配列番号 3 で示される塩基配列の第 6 番目の「g」が「a」に置換されても、本発明の目的とするプロテアーゼ活性が得られる限り、かかる置換された配列も本発明に含まれることを意味する。この点で、本発明の誘導体は、タンパク質及び DNA の両方において、配列番号 2、3、5 又は 6 に示されるアミノ酸配列又は塩基配列を実質的に含む（あるいは、実質的に該配列からなる）配列を有する、と表現することも可能である。

本発明はまた、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなる、カンジダ・ボイジニ由来プロテイナーゼ A の分泌シグナルペプチドを提供する。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、プロテイナーゼ A 遺伝子を含むプラスミド p C P R A 1 の制限酵素地図を示す。

図 2 は、プロテイナーゼ A 遺伝子破壊プラスミド p D P R A 1 の構築手順を示す。

図 3 は、*C a n d i d a b o i d i n i i* SK 6 1 2 株、SK 7 4 0 株、SK 7 4 1 株の *P E P 4* 遺伝子座の制限酵素地図を示す。

図 4 は、プロテイナーゼ B 遺伝子及び、プラスミド p C P R B 1、p C P R B 2 の制限酵素地図を示す。

図 5 は、プロテイナーゼ B 遺伝子破壊プラスミド p D P R B 1 の構造を示す。

図 6 は、*C a n d i d a b o i d i n i i* SK 7 4 1 株、SK 7 7 4 株、SK 7 7 5 の P R B 1 遺伝子座の制限酵素地図を示す。

図 7 は、プラスミド p C T C - S 1 の構築手順を示す。

図 8 は、プラスミド p E C T C - S 1 の構築手順を示す。

図 9 は、*C a n d i d a b o i d i n i i* SK 6 1 2 株及び SK 7 4 1 株



を宿主としたカテブシンC発現株の培地上清のカテブシンC活性を示す。

### 発明の詳細な説明

本発明により、カンジダ・ボイジニのプロテアーゼをコードする塩基配列が該プロテアーゼの産生が少なくとも抑制されるように改変（置換、欠失、挿入、付加、等）されたDNA、好ましくは該プロテアーゼをコードする塩基配列に形質転換マーカー遺伝子が挿入されたDNA、並びに該改変DNAを有することによりタンパク質分解活性が親株に対して著しく低下したプロテアーゼ遺伝子欠失カンジダ・ボイジニ株が提供される。

このような株の例としては、野生型のプロテイナーゼAをコードする *PEP4* 遺伝子が上述のように改変された *PEP4* 遺伝子で置換されたカンジダ・ボイジニ株であり、該株では野生型プロテイナーゼAを全く産生しないのみならず、本来、プロテイナーゼAにより活性化されるカルボキシペプチダーゼYやプロテイナーゼBなどのプロテアーゼ活性も著しく抑制されている。また、*PEP4* 遺伝子に加えてプロテイナーゼBをコードする *PRB1* 遺伝子が上述のように改変された *PRB1* 遺伝子で置換されたカンジダ・ボイジニ株も作出可能であり、このような二重変異株においては、*PEP4* 遺伝子欠失株ではわずかに活性が残存するとされるプロテイナーゼB活性も全く検出されないことが期待される。プロテアーゼ活性の低下したカンジダ・ボイジニ株、*PEP4* 遺伝子欠失株と *PEP4*、*PRB1* 遺伝子欠失株は、栄養培地を用いた培養条件下で野生株と同等の増殖能力を保持しているという特徴を有する。このことはこれらの遺伝子の有無は栄養条件下ではカンジダ・ボイジニの増殖に影響を及ぼさないことを意味する。従って本発明によるプロテアーゼ活性の抑制された酵母は異種タンパク質生産のための優れた宿主である。特に当該酵母はプロテアーゼ感受性の異種タンパク質を効率的に生産することができる。

本発明により、さらに、上記の本カンジダ・ボイジニ株を異種タンパク質をコードする遺伝子（即ち、異種遺伝子）を含む発現ベクターで形質転換して得られた形質転換体を培養し、菌体又は培養上清から目的タンパク質を回収することを

含む、異種タンパク質の製造方法が提供される。

ここで異種遺伝子とは、発現の対象となる任意の遺伝子を意味し、例えば、カテプシンC、表皮増殖因子（EGF）、インシュリン様増殖因子1（IGF-1）、ヒト血清アルブミン、エリスロポイエチン（EPO）、スロンボポイエチン（TPO）等が挙げられるが、これらに限定されない。また、異種遺伝子はいかなる手法によって得られるものであってもよい。

また、発現ベクターは、異種タンパク質の分泌のためのシグナルペプチド配列をコードするDNAを、該異種タンパク質をコードする遺伝子の5'末端に隣接（即ち、フランキング）して含むことができる。これによって、発現によって生成した異種タンパク質を細胞外へ分泌させることを可能とする。この分泌シグナルペプチドとしては、例えば、カテプシンCが本来有するシグナル配列、パン酵母の $\alpha$ 因子の分泌シグナルペプチド配列、カンジダ・ボイジニのプロテイナーゼAのシグナルペプチドが利用できる。

本発明の実施態様において、異種遺伝子として、ウシ由来のジペプチジルプロテアーゼであるカテプシンCをコードする遺伝子が例示される。本酵素は、タンパク質のN末端からアミノ酸を2つずつ分解するプロテアーゼであり、産業上有用な酵素である。この新規遺伝子は配列番号8に示されたアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質であると特徴付けられる。カテプシンCは不活性の前駆体（プレプロ体）として発現し、その後のプロセッシングにより分泌シグナルとして機能するプレペプチド領域が切断され、続いてプロペプチド領域が切断されて活性を有する成熟タンパク質になる。プロペプチド領域とは一般にタンパク質の不活性前駆体に含まれるペプチド断片であり、不活性前駆体から該ペプチドが特異的なプロテアーゼ等により切断除去されてそのタンパク質特有の活性を示す。従ってウシカテプシンCのプロペプチド配列とそれに続く成熟タンパク質を構成するポリペプチド配列が、該酵素の分泌過程での活性化にとって必要である。このために、該酵素の酵母における分泌発現には、分泌のためのシグナル配列をカテプシンCのプロペプチドのN末端に付加することが必要である。この分泌シグナルペプチドとしては上記例示のもの、好ましくはカンジダ・

ボイジニのプロテイナーゼAのシグナルペプチドを利用できる。また該タンパク質の発現にとって、上記のプロテアーゼ遺伝子欠損株は特に有用であった。

従って、本発明には、カテプシンCを生産するカンジダ・ボイジニ株、好適にはプロテアーゼ活性の低下したカンジダ・ボイジニ株、並びに、プロテアーゼ活性の低下したカンジダ・ボイジニ株を用いたウシ由来カテプシンCの製造方法も包含される。

以下、本発明をさらに詳細に説明する。

本発明者らは上記課題を解決するために、(1)カンジダ・ボイジニのプロテイナーゼA及びプロテイナーゼB遺伝子の塩基配列を解明し、(2)プロテアーゼ遺伝子破壊プラスミドを構築し、(3)本プラスミドを用いて形質転換体を作製し、プロテアーゼ遺伝子欠失カンジダ・ボイジニ株を取得した。さらに(4)プロテアーゼ遺伝子欠失カンジダ・ボイジニ株を宿主として異種遺伝子を発現させた時、その生産量が野生株を宿主としたときよりも優れていることを確認し、本発明を完成するに至ったものである。

#### (1) プロテイナーゼA及びプロテイナーゼB遺伝子

本発明の遺伝子を取得するための出発材料としては、カンジダ・ボイジニATCC 48180株が例示される。

本発明においてクローニング工程は、公知の方法(Molecular Cloning (1989), Methods in Enzymology 194 (1991))に従って行なうことが出来る。

すなわち、(a)上記酵母の全DNAに由来するDNA断片、もしくは上記酵母のmRNAより合成されたcDNA断片を組み込んだ遺伝子導入用ベクターを宿主に導入して上記酵母の遺伝子ライブラリーを作製する。(b)ついで、かかる遺伝子ライブラリーから所望のクローンを選択して、当該クローンを増幅することにより上記のクローニング工程を実施することが出来る。

#### (a) 酵母の遺伝子ライブラリーの調製

酵母の全DNAの抽出は、例えば酵母のプロトプラストを調製して、当該プロトプラストから、通常公知のDNA抽出法、すなわち細胞残渣を除去した後、高塩濃度下でDNAをアルコール沈殿し、さらにフェノールやクロロホルム抽出後

にアルコール沈殿して精製する方法を用いて行なうことが出来る。なお、上記の予めプロトプラストを調製する方法の他に、ガラスビーズ等による細胞破碎法等によってもDNAの抽出を行なうことが出来るが、高分子量のDNAを調製することが容易であるという点から上記プロトプラスト法を行なうのが好ましい。

得られた染色体DNAを適当な制限酵素によって消化し、適当なベクターに連結した後、適当な大腸菌宿主に形質転換することによってゲノミックライブラリーを得ることができる。

この際用いられるベクターとしては、通常公知の遺伝子ライブラリー調製用ベクターとして知られる、pBR系統、pUC系統、ブルースクリプト (Blue script) 系統等の一般に市販されている入手可能なプラスミドを用いることも出来る。また、gt系統やEMBL系統のファージベクターあるいはコスミド等も広く用いることが出来る。

調製した遺伝子ライブラリー作製用ベクターで形質転換もしくは形質導入を行なう宿主は、上記ベクターの種類に応じたものを採用することが出来る。

#### (b) クローンの選択

上記遺伝子ライブラリーから、所望のプロテイナーゼA及びプロテイナーゼB遺伝子を有するクローンをそれぞれの遺伝子に特有の配列を含む標識プローブを用いてコロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法等により選択し、取得することが出来る。

プローブに用いるプロテイナーゼA及びプロテイナーゼB遺伝子に特有の配列は、各種起源のプロテアーゼで保存されているアミノ酸配列より、カンジダ・ボイジニのコドン使用頻度を参考にプライマーを設計し、カンジダ・ボイジニの染色体DNAを鋳型とするPCR法により、所望するDNA断片を特異的に増幅して取得される。またカンジダ・ボイジニから精製した該プロテアーゼのアミノ酸配列に対応する2組のオリゴヌクレオチドを合成し、それらをプライマーとしてカンジダ・ボイジニの染色体DNAを鋳型とするPCR法により、所望するDNA断片を特異的に増幅して取得することも可能である。なお、合成したオリゴヌクレオチドをプローブとして用いることもできる。

上記方法により得られる所望の遺伝子の塩基配列の決定および確認は、例えばマクサム・ギルバートの化学改変法 (Maxam-Gilbert, *Methods in Enzymology*, 65, 499 (1980)) やジデオキシヌクレオチド鎖終結法 (Messing, J. と Vieire, J., *Gene*, 19, 269 (1982)) 及びその自動化された変法等により行ない得る。

## (2) プロテアーゼ遺伝子破壊プラスミドの構築

プロテアーゼをコードするDNA配列を改変して、機能的プロテアーゼタンパク質が産生できないようにされたDNA、選択マーカー遺伝子等と共に適当なベクターの中に挿入され、遺伝子破壊プラスミドとして使用される。本プラスミドを用いた部位特異的組み込みにより、染色体上の該遺伝子が置換されることにより作製することができる。ここで用いる機能的プロテアーゼタンパク質が産生できないように改変されたDNA配列とは、タンパク質をコードするDNA配列の塩基が置換されたものか、一部分を欠失するか又は少なくとも1つのヌクレオチドが挿入（若しくは付加）されたものであり、これらの改変によってタンパク質をコードするDNA配列の読み枠がずれて発現されないか、発現されても得られる生成物の機能が変異することにより、本来のプロテアーゼ活性を有するタンパク質をコードできなくなる。好ましくはこのような改変されたDNA配列は、タンパク質をコードするDNA配列中に形質転換マーカー遺伝子などを挿入することによって作製することができる。このようなDNA断片を用いて染色体上の遺伝子を破壊できると共に導入された形質転換マーカー遺伝子を指標として改変されたプロテアーゼ遺伝子を有する変異体をスクリーニングできるという利点がある。ここで使用される選択マーカー遺伝子としては、G418等の抗生物質耐性遺伝子、URA3、LEU2等の宿主の栄養要求性を相補する遺伝子が例示される。発現ベクターの構成成分をベクターに挿入することは、後記実施例の記載を参照して、あるいは慣用の技術により当業者が容易に実施することが可能である。

## (3) プロテアーゼ遺伝子欠失カンジダ・ボイジニ株の取得

プロテアーゼ活性が野生型株に比較して抑制されたカンジダ・ボイジニ株は、

上述の機能的なプロテアーゼタンパク質が産生できないように改変されたDNA配列を用いて適切な酵母宿主を形質転換して内在性の遺伝子を置き換えることにより作製することができる。このための方法としては、遺伝子置換によって染色体上の標的遺伝子を物理的に除去して改変遺伝子と置換する方法がある。これは、標的遺伝子の5'側と3'側の領域と相同的な末端配列を有する直鎖状DNA断片、好ましくは、形質転換マーカー遺伝子などの挿入により分断された遺伝子を含む改変DNA断片を用いて酵母宿主を形質転換することにより達成される。この形質転換マーカー遺伝子として好ましくは自発的な組換えにより染色体から除去され得る改変したURA3遺伝子を用いることができる。この改変したURA3遺伝子とは、その5'側と3'側とに相同なDNA配列を同一方向に配置した構造としている。これにより、酵母染色体上に組み込まれた後にこの反復配列間での自発的な組換えが生じてURA3遺伝子が抜け落ちることが可能であり、形質転換遺伝子マーカーとしてURA3遺伝子を再利用することが可能となる。この際、Ura<sup>-</sup>株は5-フルオロオロチン酸(5-FOA)耐性となることから、5-FOA感受性のUra<sup>+</sup>株の中からURA3遺伝子が自発的な相同組換えにより抜け落ちたUra<sup>-</sup>株の選択は容易である。

また、この他の方法としてポップイン・ポップアウトとも呼ばれる方法(Rothstein R., Methods Enzymol., 194, 281 (1991))を用いてもよい。これは相同組換えにより改変遺伝子を含むプラスミドDNAを標的遺伝子座に導入した後、形質転換後に生じた内在性の標的遺伝子の一部と形質転換に用いた改変遺伝子の一部とからなる2つの遺伝子の間で起きる自発的な相同組換えにより機能遺伝子が除去され、改変された遺伝子が残された株を選択するという方法である。この選択法においてもURA3遺伝子をマーカーとして用いることにより、5-FOA感受性のUra<sup>+</sup>株の中からURA3遺伝子が自発的な相同組換えにより抜け落ちたUra<sup>-</sup>株の選択は容易である。

カンジダ・ボイジニを形質転換するための方法としては、プロトプラスト法や酢酸リチウム、電気パルス法などを用いることができる。形質転換に用いるカンジダ・ボイジニ株については特に制限されないが、ATCC 48180株や、

I F O 1 0 0 3 5 株等が例示される。また、さらにこの好ましくは少なくともひとつの栄養要求性マーカー遺伝子が欠失した株であり、*URA3* 遺伝子欠失株や *LEU2* 遺伝子欠失株等が例示される。

#### (4) 異種遺伝子の発現

異種遺伝子は、転写の読み枠の方向にプロモーター配列、異種タンパク質の構造遺伝子、ターミネーター配列を有する発現ユニットと選択マーカー遺伝子等と共に適当なベクターの中に挿入された異種遺伝子発現ベクターを適当な宿主細胞に導入されることによって行われる。

プロテアーゼ遺伝子欠失型カンジダ・ボイジニ株を用いる場合、上記のようにプロテアーゼ遺伝子を破壊し、次に異種タンパク質をコードするDNAで形質転換する。もしくはすでに目的とする異種遺伝子発現ベクターで形質転換された株を後から上記のようにプロテアーゼ欠損株を取得することも可能である。さらに異種遺伝子発現ベクターと上記の改変されたプロテアーゼ遺伝子で同時に形質転換することも可能である。

組換え異種タンパク質発現のためのプロモーターとしてはカンジダ・ボイジニのアルコールオキシダーゼ遺伝子のプロモーター（特開平5-344895号公報）、ギ酸脱水素酵素遺伝子のプロモーター（国際公開第W0 97/10345号）等が例示される。ターミネーターとしては、カンジダ・ボイジニのアルコールオキシダーゼ遺伝子のターミネーター（特開平5-344895号公報）、ギ酸脱水素酵素遺伝子のターミネーター、アクチン遺伝子のターミネーター（国際公開第W0 97/10345号）等が例示される。なお、異種タンパク質N末端に分泌のためのシグナル配列を連結することにより、異種タンパク質の分泌が可能になる。このような分泌のためのシグナル配列としては本発明で提供されるプロテイナーゼAの分泌シグナルペプチド配列のほか、パン酵母（*S. cerevisiae*）の $\alpha$ 因子の分泌シグナルペプチド配列等が使用できる。

発現ベクターは宿主染色体DNAに組み込ませたり、宿主細胞内で自己複製可能な自律性複製配列を有するベクターを用いて、プラスミド状態で存在させる。宿主細胞内に存在する異種遺伝子のコピー数は1コピーでも複数であってもよい。

このようにして得られた形質転換体を培養し、得られる培養物から精製することにより、目的とする遺伝子発現産物を取得することができる。

培地としては、メタノール、グリセロール、グルコース等の1種以上の炭素源、及び酵母エキス、トリプトン、肉エキス、ペプトン、カザミノ酸、アンモニウム塩等の1種以上の窒素源に、リン酸、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、鉄、銅、マンガン、コバルト等の無機塩類を添加し、さらに必要に応じて各種ビタミン、アミノ酸、ヌクレオチド等の微量栄養素を便宜添加したものが挙げられる。

培地のpHは、5～8の範囲が好ましい。また培養温度は通常15～37℃、好ましくは28℃前後である。培養時間は24～1000時間程度であり、培養は静置、振とう、攪拌、通気下の回分培養又は連続培養により実施することができる。培養終了後、該培養物より遺伝子産物を採取するには、通常タンパク質精製手段を用いることができる。例えば、形質転換細胞内に生産された場合は、常法により菌体を超音波処理、磨砕処理、加圧破碎等により遺伝子産物を含む粗蛋白質溶液を取得する。必要に応じてプロテアーゼ阻害剤を添加する。培養上清中に生産された場合、培養液そのものから遺伝子産物を回収することができる。得られた溶液をろ過、遠心分離等により固形部分を除去し、粗タンパク質溶液を得る。必要によりプロタミン処理等による核酸の除去を行う。

粗タンパク質溶液から塩析法、溶媒沈殿法、透析法、限外ろ過法、ゲル電気泳動法、あるいはイオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等の精製手法を組み合わせることにより、目的タンパク質を分離精製することができる。

本発明によりプロテアーゼ（又はタンパク質分解）活性の減少した *Candida boidinii* 株が提供され、この酵母を宿主とした発現系において目的タンパク質の分解を防ぐことにより該タンパク質の収率を向上させることができる。

#### 実施例



本発明をさらに具体的に説明するために実施例を挙げるが、本発明はこれらにより限定されるものではない。

### 実施例 1

#### *Candida boidinii*のプロテイナーゼA遺伝子 (*PEP4*) のクローニング

*Candida boidinii* ATCC 48180株より *PEP4* 遺伝子の取得、及びその塩基配列決定を行なった。

#### (1-1) プローブの作製

パン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) (Woolford, C.A. et al., Mol. Cell. Biol. 6, 2500-2510 (1986)) 及びピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) (特表平6-506117号公報)由来のプロテイナーゼAで保存されているアミノ酸配列 (一文字表記) : D F A E A T S E P G L (配列番号10) 及び P Y D Y T L E V S G S C I (配列番号11) に対応する塩基配列のオリゴヌクレオチドを *Candida boidinii* のコドン使用頻度を考慮して以下のように合成した:  
PRA5: 5'-G A T T T Y G C W G A A G C W A C W T C W G A A C C W G G T T T -3' (配列番号12); 及び  
PRA3: 5'-A T A C A W G A W A C T T C Y A A W G T R T A A T C R T A W G G -3' (配列番号13)。

プライマーPRA5はアミノ酸配列D F A E A T S E P G L (配列番号10) に対応し、プライマーPRA3はアミノ酸配列P Y D Y T L E V S G S C I (配列番号11) に対応する塩基配列の相補鎖の配列である。

YPD培地(酵母エキス1%、ペプトン2%、グルコース2%、pH6.0)で培養した *Candida boidinii* ATCC 48180株の菌体より、酢酸カリウム法 (Methods Enzymol., 65, 404 (1980)) によって染色体DNAを調製した。

*Candida boidinii* 染色体DNAと、プライマーPRA5、P

RA3を混合し、Ex Taqポリメラーゼ（宝酒造社）を用いたPCR（（94℃で30秒、50℃で1分、72℃で2分）×30サイクル）を行った。増幅された約0.6kbのDNA断片を回収し、pT7 Blue T-Vector（ノバジェン社）にクローニングした。Dye primer cycle sequencing FS Ready Reaction Kit（パーキンエルマー社）を用いて、得られたプラスミドの挿入DNA断片の塩基配列を決定したところ、*Saccharomyces cerevisiae*及び*Pichia pastoris*由来のPEP4遺伝子のアミノ酸配列と高い相同性を持つアミノ酸配列をコードする塩基配列が認められたので、このDNA断片を*Candida boidinii*のPEP4遺伝子の一部であると断定した。0.6kbの挿入DNA断片は、プラスミドをSalIとEcoRIで切断し、アガロース電気泳動後、回収した。

#### （1-2）ライブラリーの作製、及びスクリーニング

*Candida boidinii* ATCC48180株の染色体DNAを種々の制限酵素で切断し、0.8%アガロースゲル電気泳動を行った。分離したDNAをHybond N+ナイロンメンブレン（アマシャム社）トランスファーした。実施例（1-1）で得られたDNA断片をメガプライマーDNAラベリングシステム（アマシャム社）を用いて放射性標識し、サザンハイブリダイゼーションを行なった。ハイブリダイゼーションは、常法（Molecular cloning 2nd edn., Sambrook, J., et al., Cold Spring Harbor Laboratory U.S.A., 1989）に従って行った。結果、約5.5kbのEcoT22I断片にPEP4遺伝子が存在すると考えられた。そこでそのDNA断片をクローニングすべく、ライブラリーを作製した。*Candida boidinii*の染色体DNAをEcoT22Iで切断し、アガロース電気泳動後、5.5kb付近のDNA断片をゲルから回収した。回収したDNA断片をPstIで切断したpUC118とライゲーションした後、Hanahanの方法（Gene, 10, 63 (1980)）で大腸菌DH5α株に形質転換して、ライブラリーを作製した。

これらライブラリーを前述のDNA断片をプローブとしたコロニーハイブリダ

イゼーションによりスクリーニングした。得られた陽性クローンの中から、プラスミド p C P R A 1 及び挿入断片が逆方向である p C P R A 2 を保持するクローンを選抜した。

### (1-3) 塩基配列決定

プラスミド p C P R A 1 の制限酵素地図を作製した (図 1)。プラスミド p C P R A 1 を種々の制限酵素で切断し、サザンハイブリダイゼーションによる解析を行った結果、P E P 4 遺伝子は図 1 の約 3.5 kb の B g l I I - E c o T 2 2 I 領域に存在すると考えられた。本領域の塩基配列の決定を行うために、2.2 kb の B g l I I - E c o R V 断片 (図 1 で下線で示された B g l I I と E c o R V 間の領域) を平滑末端化した後、p U C 1 8 の S m a I 部位に、1.7 kb の H i n d I I I 断片 (図 1 で下線で示された H i n d I I I 間の領域) を p B l u e s c r i p t I I S K + の H i n d I I I 部位に、それぞれ両方向でクローニングした。それぞれのプラスミドより欠失変異体を、double-stranded Nested Deletion Kit (ファルマシア社) を用いて取得した。塩基配列を Dye primer cycle sequencing FS Ready Reaction Kit 及び Dye terminator cycle sequencing FS Ready Reaction Kit (パーキンエルマー社) を用いて決定した。得られた塩基配列をつなぎ合わせるにより、配列番号 1 に示す塩基配列が得られた。

配列番号 1 の塩基配列には、1009 番目から始まり、2271 番目で終わる 1263 塩基対からなるオープンリーディングフレームが存在する。このオープンリーディングフレームから推定されるアミノ酸配列 (配列番号 2) と、*Saccharomyces cerevisiae* 及び *Pichia pastoris* 由来のプロテイナーゼ A との相同性を調べたところ、それぞれ 75%、68% のアミノ酸が同一であった。シグナル配列切断点予測 (von Heijine, Nucleic. Acids Res., 14, 4683 (1986)) により推定されるシグナルペプチドはメチオニンから 22 番目のアラニンまでの 22 アミノ酸であった。

## 実施例 2

*Candida boidinii*のプロテイナーゼA遺伝子(*PEP4*) 破壊株の作製

*Candida boidinii*のURA3遺伝子をマーカーとした形質転換によって、*PEP4*遺伝子を破壊した。宿主として、*Candida boidinii* ATCC 48180株のURA3遺伝子の変異株 *Candida boidinii* SK612株を用いた。*Candida boidinii* SK612株は公知の方法 (Sakai Y. et al., J. Bacteriol., 173, 7458(1991)) に従って取得した。

(2-1) *PEP4* 遺伝子破壊ベクターの作製

図2に示すように、*PEP4*遺伝子の約2kbのSnaBI-EcoRV領域をURA3遺伝子に置換したプラスミドpDPRA1を作製した。*PEP4*遺伝子破壊株より、再びウラシル要求株を取得するために、Sakaiらの報告 (Sakai Y. et al., J. Bacteriol., 174, 7458 (1992)) に基づき、構造遺伝子の前後に、反復構造を持ったURA3遺伝子をマーカーとして用いた。

*Candida boidinii*のURA3遺伝子 (Sakai Y. et al., J. Ferment. Bioeng., 73, 255 (1992)) を含む2.6kbのSalI-PstI断片を、pBluescript II SK-のSalIとPstI部位の間に挿入したpCBU3を作製した。pCBU3をSalIで切断し、T4 DNAポリメラーゼにより平滑末端処理した後、さらにXbaIで切断して、0.9kbのURA3遺伝子の5'側を含むDNA断片を単離した。またpCBU3をPstIで切断し、T4 DNAポリメラーゼにより平滑末端処理した後、さらにKpnIで切断して得られた2.6kbのDNA断片と前述の0.9kbのDNA断片をpUC19のKpnI-XbaIに挿入し、プラスミドpURPを得た。その結果、pURPをSalI切断して得られる3.5kbのDNA断片には、URA3構造遺伝子の前後に約0.9kbの反復配列が存在することになる (図2)。

pCPR A1と逆向きにPEP4遺伝子が挿入されたpCPR A2をSnaBIとEcoRVで切断し、XhoIリンカー（宝酒造社）を挿入した。得られたプラスミドのXhoI部位にpURPをSalI切断して得られる3.5kbのDNA断片を挿入し、プラスミドpDPRA1を得た（図2）。

## （2-2）形質転換

本実施例の（2-1）で得られたpDPRA1をSalIで切断して、*Candida boidinii* SK612株に酢酸リチウム法（Ito, H. et al., J. Bacteriol., 153, 163 (1983)）で形質転換を行った。得られた形質転換体についてその染色体DNAのサザン解析を行うことにより、PEP4遺伝子破壊株をスクリーニングした。すなわち宿主SK612株及び形質転換株の染色体DNAをSalIとNdeIで切断し、pCPR A1をSalIとSnaBI切断してえられる1.7kbのDNA断片をプローブとしてサザン解析を行った（図3）。図3に示すように宿主SK612株では3.8kbにバンドが検出されるが、破壊株では5.4kbの位置にバンドが検出される。

該破壊株を*Candida boidinii* SK740株と命名した。*Candida boidinii* SK740株をYPD培地で定常期まで培養した後、5-フルオロオロチジン酸（5-FOA）に耐性を示す株を取得した。5-FOA耐性株の取得は実験書（石田功、安東民衛／編、遺伝子発現実験マニュアル、講談社サイエンティフィク、1994）に記載の方法に従った。5-FOA耐性株の染色体DNAをPEP4遺伝子破壊株を取得した際と同様のサザン解析を行うことによって、URA3遺伝子が欠落した株をスクリーニングした。図3に示すようにSK740株では5.4kbの位置に検出されるバンドが、URA3遺伝子が欠落した株では2.8kbの位置にバンドが検出された。URA3遺伝子が欠落した酵母を*Candida boidinii* SK741と命名し、平成10年9月1日付で通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1-1-3）にブタペスト条約下に国際寄託され、受託番号FERMBP-6482が与えられた。

## 実施例 3

*Candida boidinii*のプロテイナーゼB遺伝子  
(PRB1)のクローニング

*Candida boidinii* ATCC 48180株よりPRB1遺伝子の取得、及びその塩基配列決定を行なった。

## (3-1) プローブの作製

*Saccharomyces cerevisiae* (Moehle, C.M. et al., Mol. Cell. Biol. 7, 4390-4399 (1987)) 及び *Pichia pastoris* (特表平6-506117号公報) 由来のプロテイナーゼBで保存されているアミノ酸配列(一文字表記): GNGHGHGTHCAGT (配列番号14) 及び ATAVLSGTSMA (配列番号15) に対応する塩基配列のオリゴヌクレオチドを *Candida boidinii* のコドン使用頻度を考慮して以下のように合成した:

PRB5: 5'-GGTAAYGGTCAYGGTACHCAYTG TGCH  
GGWAC-3' (配列番号16); 及び

PRB3: 5'-GCCATWGAWGTAGCWGATAARACDGCW  
GTDGC-3' (配列番号17)。

プライマーPRB5はアミノ酸配列GNGHGHGTHCAGT (配列番号14) に対応し、プライマーPRB3はアミノ酸配列ATAVLSGTSMA (配列番号15) に対応する塩基配列の相補鎖の配列である。

*Candida boidinii* ATCC 48180株の染色体DNAと、プライマーPRB5、PRB3を混合し、Ex Taqポリメラーゼ(宝酒造社)を用いたPCR((94℃で30秒、50℃で1分、72℃で2分)×30サイクル)を行った。増幅された約0.5kbのDNA断片を回収し、pT7 Blue T-Vector(ノバジェン社)にクローニングした。Dye primer cycle sequencing FS Ready Reaction Kit(パーキンエルマー社)を用いて、

得られたプラスミドの挿入DNA断片の塩基配列を決定したところ、*Saccharomyces cerevisiae*及び*Pichia pastoris*由来のPRB1遺伝子のアミノ酸配列と高い相同性を持つアミノ酸配列をコードする塩基配列が認められたので、このDNA断片を*Candida boidinii*のPRB1遺伝子の一部であると断定した。0.5 kbの挿入DNA断片は、プラスミドをSalIとEcoRIで切断し、アガロース電気泳動後、回収した。

### (3-2) ライブラリーの作製及びスクリーニング

*Candida boidinii* ATCC 48180株の染色体DNAを種々の制限酵素で切断し、0.8%アガロースゲル電気泳動を行った。分離したDNAをHybond N+ナイロンメンブレン（アマシャム社）トランスファードした。本実施例の(3-1)で得られたのDNA断片をメガプライマーDNAラベリングシステム（アマシャム社）を用いて放射性標識し、サザンハイブリダイゼーションを行なった。その結果、PRB1遺伝子は約5.5 kbのEcoRI-HindIII断片、約4.5 kbのBglII-EcoT22I断片に存在することが示された。次に、約5.5 kbのEcoRI-HindIII断片、約4.5 kbのBglII-EcoT22I断片をクローニングすべく、ライブラリーを作製した。*Candida boidinii*の染色体DNAをEcoRIとHindIIIで切断し、アガロース電気泳動後、5.5 kb付近のDNA断片をゲルから回収した。回収したDNA断片をpUC19のEcoRIとHindIII部位の間に挿入し、EcoRI-HindIIIプラスミドライブラリーを作製した。同様にしてBglII-EcoT22I断片をpBluescript II SK+のBamHIとPstI部位の間に挿入したBglII-EcoT22Iプラスミドライブラリーを作製した。

これらライブラリーに上記プローブを用いたコロニーハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行った。オートラジオグラフィーによって、EcoRI-HindIIIプラスミドライブラリーからpCPRB1、BglII-Eco

o T 2 2 I プラスミドライブラリーから p C P R B 2 を保持するクローンが陽性クローンとして選抜された。

p C P R B 1 及び p C P R B 2 の制限酵素地図を作製した (図 4)。得られたクローンが *Candida boidinii* の P R B 1 遺伝子であることを確認すること、及び *Candida boidinii* の P R B 1 遺伝子のオープンリーディングフレームの位置及び方向を推定することを目的として、前述したゲノミックサザン解析によりプローブがハイブリダイズした最小の DNA 断片の約 0.7 kb の C l a I 領域の塩基配列を決定した。この塩基配列の決定は p C P R B 2 より取得した 0.7 kb の C l a I 断片を、p B l u e s c r i p t I I S K + に挿入して作製したプラスミドを用いて行った。得られた塩基配列 (配列番号 6) から推定されるアミノ酸配列 (配列番号 5) と、*Saccharomyces cerevisiae* 及び *Pichia pastoris* 由来のプロテイナーゼ B との相同性を調べたところ、それぞれ 76%、77% のアミノ酸が同一であった。この結果より *Candida boidinii* の P R B 1 遺伝子のオープンリーディングフレームは図 4 の矢印で示した領域に存在することが推定された。

#### 実施例 4

##### *Candida boidinii* のプロテイナーゼ B 遺伝子

##### (P R B 1) 破壊株の作製

*Candida boidinii* の U R A 3 遺伝子をマーカーとした形質転換によって、P R B 1 遺伝子を破壊した。宿主として、実施例 2 で取得した *Candida boidinii* S K 7 4 1 株を用いた。

##### (4-1) P R B 1 遺伝子破壊ベクターの作製

P R B 1 遺伝子の約 0.7 kb の C l a I 領域を U R A 3 遺伝子に置換したプラスミド p D P R B 1 を次のように作製した。

p C P R B 2 を C l a I と E c o R I で切断して得られた約 2.0 kb の D N



A断片を、pCPRB1のC1aI-EcoRI領域に挿入した。得られたプラスミドをpCPRBΔC1aと命名した。pCPRBΔC1aをC1aIで切断し、T4 DNAポリメラーゼによる平滑末端処理した後、XhoIリンカーを挿入した。得られたプラスミドのXhoI部位に実施例2の(2-1)に記載のpURPをSalI切断して得られる3.5kbのDNA断片を挿入し、プラスミドpDPRB1を得た(図5)。

#### (4-2) 形質転換

本実施例の(4-1)で得られたpDPRB1をHincIIとEcoRIで切断して、*Candida boidinii* SK741株に酢酸リチウム法で形質転換を行った。得られた形質転換体についてその染色体DNAのサザン解析を行うことにより、PRB1遺伝子破壊株をスクリーニングした。すなわち宿主SK741株及び形質転換株の染色体DNAをBglIIとHindIIIで切断し、pCPRB1をC1aIとBglII切断して得られる1.3kbのDNA断片をプローブとしてサザン解析を行った(図6)。図6に示すように宿主SK741株では3kbの位置に検出されるバンドが、破壊株では5.8kbに検出される。

該破壊株を*Candida boidinii* SK774株と命名した。*Candida boidinii* SK774株より5-FOA耐性株を取得し、URA3遺伝子が欠落した株をスクリーニングした。スクリーニングはサザン解析によって行った。図6に示すようにSK774株では5.8kbの位置に検出されるバンドが、URA3遺伝子が欠落した株では3.2kbの位置に検出された。該酵母を*Candida boidinii* SK775株と命名した。

### 実施例 5

#### プロテアーゼ欠損株のプロテアーゼ活性の測定

実施例2の(2-2)で得られた*Candida boidinii* SK740 (pep4)株及び実施例4の(4-2)で得られた*Candida b*

*oidinii* SK774 (p e p 4, p r b 1) 株、および *C a n d i d a b o i d i n i i* ATCC 48180 株の示すプロテアーゼ活性を測定した。それぞれの株を 2 m l の Y P D 培地で、30℃で定常期まで培養した。集菌した菌体を 0.2 m l の 100 m M T r i s - H C l バッファー (p H 7.5) に懸濁し、0.8 g のガラスビーズ (0.425 - 0.6 m m、シグマ社) を加え、1 分間激しく攪拌後、1 分間氷冷するという操作を 5 回繰り返した。菌体破碎液を 4℃、10000 回転にて 10 分間遠心し、上清画分を無細胞抽出液として取得した。プロテインアッセイキット (バイオ・ラッド社) を用いて、無細胞抽出液のタンパク質濃度を測定した。

無細胞抽出液の酵素活性は、J o n e s の総説 (Jones, E. W., Methods Enzymol., 194, 428 (1991)) に従い、プロテイナーゼ A 活性及びカルボキシペプチダーゼ Y 活性を測定した。すなわち、プロテイナーゼ A 活性は、25  $\mu$  l の無細胞抽出液、終濃度 100 m M G l y c i n e - H C l バッファー (p H 3.2)、1% の酸変性ヘモグロビンを含む 1 m l の反応液中 37℃で測定した。0 分後、10 分後、20 分後、30 分後にそれぞれ 200  $\mu$  l の反応液を抜き取った後、100  $\mu$  l の 1 N 過塩素酸を加え、10000 回転にて 10 分間遠心した。上清 100  $\mu$  l を抜き取り、50  $\mu$  l の 0.5 M N a O H を加え、本溶液中の遊離ペプチド含量を D C プロテインアッセイキット (バイオ・ラッド社) を用いて測定した。プロテイナーゼ A 活性は、1 分間に 1  $\mu$  g のペプチドを遊離する酵素量を 1 ユニットと定義した。ATCC 48180 株では無細胞抽出液 1 m g 当たり 49.3 ユニットのプロテイナーゼ A 活性が検出されたが、SK740 株及び SK774 株では該活性は検出されなかった。

カルボキシペプチダーゼ Y 活性は、100  $\mu$  l の無細胞抽出液と 500  $\mu$  l のバッファー (100 m M T r i s - H C l (p H 7.5)、1 m M C a C l<sub>2</sub>) 及び 20  $\mu$  l の基質溶液 (ジメチルホルムアミドで溶解させた 6 m M N - ベンゾイル-L-チロシン-p-ニトロアニリド (シグマ社)) を混合して、よく攪拌した後、37℃で 30 分間反応した。これに 600  $\mu$  l の 1.5 M 酢酸を加え、反応を停止し、0.22  $\mu$  m のフィルターでろ過し、405 n m における吸光度

を測定した。カルボキシペプチダーゼY活性は、1分間に1nmolのp-ニトロアニリンを遊離する酵素量を1ユニットと定義した。ATCC48180株、SK740株、SK774株が示す無細胞抽出液1mg当たりそれぞれ、0.72ユニット、0.28ユニット、0.05ユニットのカルボキシペプチダーゼY活性が検出され、プロテアーゼ遺伝子欠損により、カルボキシペプチダーゼY活性が大幅に減少することが確認された。

## 実施例 6

### 異種遺伝子タンパク質の分泌生産

プロテアーゼ遺伝子が破壊された *Candida boidinii* 株を用いてウシ由来カテプシンC遺伝子を発現することにより、カテプシンCの分泌量が増大することを確認した。また実施例1の(1-3)で得られた *PEP4* 遺伝子のプレ配列が異種遺伝子タンパク質を分泌させるためのシグナル配列として機能することも確認した。

#### (6-1) ウシ由来カテプシンC遺伝子のクローニング

既に報告されているヒト由来カテプシンC遺伝子をPCRにて取得し、得られたDNA断片をプローブとして用いた。ヒトカテプシンC遺伝子の塩基配列 (Patris, A. et al., FEBS Lett., 369, 326 (1995)) に従い、以下のオリゴオリゴヌクレオチドを合成した:

HCat-5: 5'-CAAGGCTTTGAGATTGTGTTGAATGACTAC-3' (配列番号18) 及び

HCat-3: 5'-TCTGAGATTGCTGCTGAAAGTCTACAGTCT-3' (配列番号19)。

鋳型DNAとしてQUICK-Screen Human cDNA Library Panel (Clontech社)を用いた。鋳型DNAと、プライマーHCat-5、HCat-3を混合し、Ex Taqポリメラーゼ (宝酒造社)を用いたPCR ((94℃で30秒、60℃で30秒、72℃で2分) × 3

0 サイクル) を行った。胎盤由来のライブラリーから増幅された約 1.2 kb の DNA 断片を回収し、pT7 Blue T-Vector (ノバジェン社) にクローニングした。Dye primer cycle sequencing FS Ready Reaction Kit (パーキンエルマー社) を用いて、塩基配列を決定し、ヒト由来カテプシンC遺伝子が挿入されていることを確認した。1.2 kb の挿入DNA断片は、プラスミドを Sma I と Xba I で切断し、アガロース電気泳動後、回収し、プローブDNA断片として用いた。

ウシカテプシンC遺伝子を取得するためのライブラリーとして、ストラタジーン社から購入したBovine Spleen cDNAライブラリーを用いた。添付のプロトコールに従って出現させた約100万の組み換えファージクローンよりブラックハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。得られた6個の陽性組み換えファージとライブラリーに添付のヘルパーファージと共に、大腸菌XL1-Blue MRF'株に感染させ37℃で3時間培養し、目的cDNA断片を有するpBluescriptを切り出した。培養液を70℃で20分間処理した上清液を大腸菌SOLR™株に感染させ、組み換えプラスミドDNAを有する大腸菌をアンピシリン耐性により選抜した。

6個の組み換えプラスミドをDye primer cycle sequencing FS Ready Reaction Kit (パーキンエルマー社) を用いて、5'末端側、3'末端側の塩基配列を決定した結果、最も長いcDNA断片を有するクローンとしてpBC20-2を選抜した。Dye terminator cycle sequencing FS Ready Reaction Kit (パーキンエルマー社) を用いてpBC20-2の挿入DNA断片の塩基配列を決定し、配列番号7に示す塩基配列を得た。得られた塩基配列より配列番号8に示すアミノ酸配列が演繹された。この配列とヒトカテプシンCのアミノ酸配列を比較したところ、89%のアミノ酸が同一であった。プロ領域のN末端は配列番号8の20番目のアスパラギン酸、成熟領域のN末端は配列番号8の226番目のロイシンであると考えられた。pBC20-2には開始メチオニンをコードする配列が含まれておらず、プレ領域の一部は欠損していると考えられた。

## (6-2) ウシカテブシンC発現プラスミドの構築

本実施例の(6-1)で得られたウシカテブシンCを *Candida boidinii* を用いて分泌発現させるために、実施例1の(1-3)で得られたプロテイナーゼAのプレ領域(配列番号4)をウシカテブシンCのプロ領域-成熟領域のN末端側に連結した。またウシカテブシンCのプロ領域-成熟領域の塩基配列は、*Candida boidinii* において使用頻度の高いコドンを用いた塩基配列配列に変換した。さらに構造遺伝子の翻訳開始コドン(ATG)の5'上流側及び翻訳終止コドン(TAA)の3'下流側にNot I 認識部位が形成されるように設計した(配列番号9)。設計したDNAは図7に示す方法で、PCRを用いて合成した。図7中の各プライマーの塩基配列を以下に示す：

A1F: 5'-GTACATATCCAGATCTATTAGGTACTTGGGTCTTTCAAGTTGGTTCTTCTGGTTCACAAAGAGATGTTAATTGTTCTGTTATGGGTCCTCCAGAGAAGAAAGTTGTCGTTCACTTAAAGAACTTG-3' (配列番号20) ;

A1R: 5'-GCAAACCATTTATAATCATTTCAAGACAATTTCGAAACCTTGATTATAGATAATAGTGAAATGACCAGAATTACCAAAATCATCATAAGCAGTATCAAGTTTCTTTAAGTGAACGACAACCTTTCTTC-3' (配列番号21) ;

A2F: 5'-GGGGGGGCGGCCGCGCATGAAGTTCACAAATTCCTTTTTCTGTCGCTTTCTCTATCTTAGCTGCTACTACTTTAGTTGATGCTGATACTCCAGCTAATTGTACATATCCAGATCTATTAGGTACTTGGG-3' (配列番号22) ;

A2R: 5'-CCCCCACTAGTCCTAGGACATCATGAACC CAACCTGTCATAGTTTTCATGACAATAAGAAGTAACTTTACCACCTTCTTCTTTTATATTTAAAGAAAGCAAACCATTTATAATCATTTCAAGACAATTTTCG-3' (配列番号23) ;

B1F: 5'-CGTTAATACTGCTAGATTAGCTGGTTTAG

AAGAAACATACTCTAATAGATTATATCGTTATAATC  
ATGATTTTCGTCAAAGCTATTAATGCTATTCAAAAAT  
CTTGGAC-3' (配列番号24) ;

B1R: 5'-TACGAGAATGACCACCACCTCTTCTAATC  
ATTTCTTTAAGAGTTAATGTTTTCATATTCCATATAA  
GGAGCAGCAGTCCAAGATTTTTTGAATAGCATTAATA  
GCTTTG-3' (配列番号25) ;

B2F: 5'-GGGGGGCGGGCCGCGGGGCCTAGGTAGAAA  
TTGGGCTTGTTTCACTGGTAGAAAGACTGGTAATAC  
TTCTGAAAATGTTAACGTTAATACTGCTAGATTAGC  
TGGTTTAGAAG-3' (配列番号26) ;

B2R: 5'-CCCCCACTAGTAGGTAAGTGTAAGATTTT  
CTTCTGAATTTTCAGCAGTAATAGGTGCAGGTTTAGG  
TCTAGGTATTCTACGAGAATGACCACCACCTCTTCT  
AATCA-3' (配列番号27) ;

C1F: 5'-TTGCTTCTATGGGTATGATGGAAGCTAGA  
ATTAGAATTTTGACTAATAATACTCAAACCTCCTATC  
TTATCTCCACAAGAAGTTGTCTCTTGTTCTCAATAT  
GCTCAAGGTTGTGAAGGTG-3' (配列番号28) ;

C1R: 5'-ATGGAGAATCAGTACCAGTATATGGAAAA  
CAATCTTCTTCAACTAGACCAAAGTCCTGAGCATAT  
TTACCAGCAATTAAGTATGGGAAACCACCTTCACAA  
CCTTGAGCATATTGAGAAC-3' (配列番号29) ;

C2F: 5'-GGGGGACTAGTTGGGATTGGAGAAATGTT  
CATGGTATTAACCTTTGTTACTCCTGTTAGAAATCAA  
GGTTCATGTGGTTCTTGTTACTCATTTGCTTCTATG  
GGTATGATGGAAGCTAGAATTAGAATTTTGAC-3'  
(配列番号30) ;

C2R: 5'-CCCCCAAGCTTCATTACAACCAACCATAGA  
AACCAACCAACATAATGATATTCAGAAGAGTAATATC  
TGAAACAACCTTCTTTCAATCTACATGGAGAATCAG  
TACCAGTATATGGAAAAC-3' (配列番号31) ;

D1F: 5'-ATTATAGAAAAGGTGTTTATCATCACACT  
GGTTTAAGAGATCCATTTAATCCATTTGAGCTCACT  
AATCATGCTGTCTTATTAGTTGGTTATGGTACTGAT  
GCTGCTTCTG-3' (配列番号32) ;

D1R: 5'-GTACCTCTTCTAATTCTAAAGTAACCATTT  
TTCACCCCAAGAAGTACCCCATGAGTTCTTAACAAT  
CCAATAATCTAAACCAGAAGCAGCATCAGTACCATA  
ACCAACTAATAAG-3' (配列番号33) ;

D2F: 5'-GGGGGAAGCTTTGATGAAATTAGAATTAG  
TTCATCAAGGTCCTATGGCTGTTGCTTTTGAAGTCT  
ATGATGATTTCTTACATTATAGAAAAGGTGTTTATC  
ATCACACTG-3' (配列番号34) ; 及び

D2R: 5'-CCCCCCTCGAGGCGGCCGCTTATAATTTA  
GGAATAGGAGTAGCAGCTAAAGCAATAGATTCAATA  
GCACATTTCATCAGTACCTCTTCTAATTCTAAAGTAA  
CCATTTTTC-3' (配列番号35) 。

領域Aは、まずプライマーA1FとA1Rを混合し、Ex Taqポリメラーゼ（宝酒造社）を用いたPCR（（94℃で30秒、60℃で1分、72℃で30秒）×20サイクル）を行い、2本鎖DNAを合成した。反応終了後、フェノール／クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、PCR反応液の2分の1容量（25μl）のTEバッファーに溶解した。この溶液2μlとプライマーA2FとA2Rを混合し、Ex Taqポリメラーゼ（宝酒造社）を用いたPCR（（94℃で30秒、60℃で1分、72℃で30秒）×20サイクル）を行った。増幅されたDNA断片を回収し、NotIとSpeIで切断した後、pB1

uescript II KS+のNot I-Spe I間に挿入した。Dye primer cycle sequencing FS Ready Reaction Kit (パーキンエルマー社)を用いて、領域Aが正しく合成されていることを確認した。得られたプラスミドをpCT-Aと命名した。

領域B、C、Dについても図7に示すプライマーを用いて領域Aと同様の方法で合成し、それぞれpBluescript II KS+に挿入したプラスミドpCT-B、pCT-C、pCT-Dを得た。

pCT-Aから切り出したNot I-Sty I断片をpCT-BのNot I-Sty I間に挿入したプラスミドpCT-AB、pCT-Cから切り出したSpe I-Hind III断片をpCT-DのSpe I-Hind III間に挿入したプラスミドpCT-CDを作製した。pCT-CDから切り出したSpe I-Xho I断片をpCT-ABのSpe I-Xho I間に挿入し、プラスミドpCTC-S1を作製した。

pCBU3から切り出した*Candida boidinii* URA遺伝子を含む2.6 kbのSal I-Pst I断片とpFdhPT (WO97/10345) から切り出した*Candida boidinii* ギ酸脱水素酵素遺伝子プロモーター/ターミネーター領域を含む2.1 kbのKpn I-EcoT22 I断片をpUC19のKpn I-Sal I間に挿入して、マーカー遺伝子がURA<sub>3</sub>遺伝子で、ギ酸脱水素酵素遺伝子プロモーター/ターミネーターによる異種遺伝子発現プラスミドpFexU3を作製した(図8)。pCTC-S1から切り出したカテプシンC遺伝子を含むNot I断片をpFexU3のNot I部位に挿入し、ウシカテプシンC発現プラスミドpECTC-S1を作製した(図8)。

### (6-3) 形質転換

本実施例の(6-2)で得たプラスミドpECTC-S1をBamHIで切断し、*Candida boidinii* SK612株、SK741株に形質転換した。得られた形質転換体のコロニーを各宿主株につき10個拾い、培地中に



分泌されるカテプシンC活性を測定した。

まず、GLYS培地（グリセロール3%、Yeast Nitrogen Base 0.67%、Yeast Extract 0.5%を含むpH5.5の培地）中で30℃にて、48時間振とう培養した。3000回転、5分間の遠心で集菌した菌体をGLYS培地と等量のMYS（メタノール1.5%、Yeast Nitrogen Base 0.67%、Yeast Extract 0.5%を含むpH5.5の培地）に懸濁し、さらに30℃にて、48時間振とう培養した。培養後、3000回転、5分間の遠心によって取得した培養上清をマイクロコンー30（アミコン社）を用いて50倍濃縮し、以下に示す方法でカテプシンC活性を測定した。

2  $\mu$ lの濃縮培養上清と、200  $\mu$ lのバッファー（50mMクエン酸-クエン酸ナトリウムバッファー（pH5.0）、10mM NaCl、1mM  $\beta$ -メルカプトエタノール、及び基質の4mM Glycyl-L-phenylalanine-p-nitroanilide（シグマ社、ジメチルホルムアミドで200mMに溶解させたものを希釈））を混合した後、37℃で2～10時間放置し、405nmにおける吸光度を測定した。標準品としてベーリンガー社から購入したウシカテプシンCの16、8、4、2、1、0.5  $\mu$ g/ml溶液を調製し、これを試料として作製した標準曲線から、各サンプルのカテプシンC活性を算出した。

各形質転換株が示したカテプシンC生産量を図9に示す。図9に示すようにプロテイナーゼ遺伝子が破壊された*Candida boidinii*株を宿主として用いた場合の方が、カテプシンC生産性に優れていた。

本明細書で引用した特許出願を含む全ての刊行物の全体を参考として本明細書に取り込むものとする。また、本発明は、その思想または主要な特徴から逸脱することなく、他のいろいろな形で実施することができる。そのため、前述の実施例はあらゆる点で例示にすぎず、限定的に解釈されてはならない。本発明の範囲は、添付の請求の範囲によって示されるものであって明細書本文には何ら拘束

されない。さらに、請求の範囲の均等範囲に属する変形や変更はすべて本発明の範囲内のものであると理解されるべきである。

## 配列表フリーテキスト

配列番号 9 : プロテイナーゼ A のプレ領域と牛カテプシン C のプロ成熟領域とともに、該構造遺伝子の開始コドン (ATG) の 5' 側および終止コドンの 3' 側に NotI 認識部位を含む配列をコードするヌクレオチド配列を示す。

配列番号 12 : 配列番号 10 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を示す。

配列番号 13 : 配列番号 11 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列に相補的な配列を示す。

配列番号 16 : 配列番号 14 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を示す。

配列番号 17 : 配列番号 15 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列に相補的な配列を示す。

配列番号 20 : 配列番号 9 によって表される DNA の PCR 合成のためのプライマー A1F を示す。

配列番号 21 : 配列番号 9 によって表される DNA の PCR 合成のためのプライマー A1R を示す。

配列番号 22 : 配列番号 9 によって表される DNA の PCR 合成のためのプライマー A2F を示す。

配列番号 23 : 配列番号 9 によって表される DNA の PCR 合成のためのプライマー A2R を示す。

配列番号 24 : 配列番号 9 によって表される DNA の PCR 合成のためのプライマー B1F を示す。

配列番号 25 : 配列番号 9 によって表される DNA の PCR 合成のためのプライマー B1R を示す。

配列番号 26 : 配列番号 9 によって表される DNA の PCR 合成のためのプライマー B2F を示す。

配列番号 27 : 配列番号 9 によって表される DNA の PCR 合成のためのプライマー B2R を示す。

配列番号28 : 配列番号 9 によって表されるDNAのPCR合成のためのプライマーC1Fを示す。

配列番号29 : 配列番号 9 によって表されるDNAのPCR合成のためのプライマーC1Rを示す。

配列番号30 : 配列番号 9 によって表されるDNAのPCR合成のためのプライマーC2Fを示す。

配列番号31 : 配列番号 9 によって表されるDNAのPCR合成のためのプライマーC2Rを示す。

配列番号32 : 配列番号 9 によって表されるDNAのPCR合成のためのプライマーD1Fを示す。

配列番号33 : 配列番号 9 によって表されるDNAのPCR合成のためのプライマーD1Rを示す。

配列番号34 : 配列番号 9 によって表されるDNAのPCR合成のためのプライマーD2Fを示す。

配列番号35 : 配列番号 9 によって表されるDNAのPCR合成のためのプライマーD2Rを示す。

## 請求の範囲

1. プロテアーゼ活性の低下したカンジダ・ボイジニ (*Candida boidinii*) 株。
2. プロテイナーゼA、プロテイナーゼB又はその両方のプロテアーゼ活性が喪失された、請求項1に記載のカンジダ・ボイジニ株。
3. カンジダ・ボイジニSK740株、SK741株、SK774株又はSK775株である、請求項2に記載のカンジダ・ボイジニ株。
4. 請求項1～3のいずれかに記載のカンジダ・ボイジニ株を、有用な異種タンパク質をコードする遺伝子を含む発現ベクターで形質転換し、適当な培地にて培養し、生成した異種タンパク質を回収することを含む、タンパク質の製造方法。
5. 異種タンパク質がカテプシンCである、請求項4に記載の方法。
6. 発現ベクターが、異種タンパク質をコードする遺伝子の5'末端に隣接して分泌シグナルペプチド配列をコードするDNAを含む、請求項4又は5に記載の方法。
7. 分泌シグナルペプチド配列がプロテアーゼタンパク質由来のものである、請求項6に記載の方法。
8. 分泌シグナルペプチド配列が配列番号4に示すアミノ酸配列からなる、請求項7に記載の方法。
9. 配列番号2に示される23位～420位のアミノ酸配列、あるいはその配列において少なくとも80%の相同性を有するように1個以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつプロテアーゼ活性を有するカンジダ・ボイジニ株由来のプロテイナーゼA又はその誘導体。
10. 請求項9に記載のカンジダ・ボイジニ株由来のプロテイナーゼA又はその誘導体をコードするDNA。
11. 配列番号2に示されるアミノ酸配列、あるいはその配列において少なくとも80%の相同性を有するように1個以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する、カンジダ・ボイジニ株由来の前駆体プロテイナーゼA又はその誘導体。
12. 請求項11に記載のカンジダ・ボイジニ株由来の前駆体プロテイナーゼA

又はその誘導体をコードするDNA。

13. 配列番号3に示される塩基配列を有する、請求項12に記載のDNA。

14. 配列番号5に示されるアミノ酸配列、あるいはその配列において少なくとも80%の相同性を有するように1個以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつプロテアーゼ活性を有するカンジダ・ボイジニ株由来のプロテイナーゼB又はその誘導体。

15. 請求項14に記載のカンジダ・ボイジニ株由来のプロテイナーゼB又はその誘導体をコードするDNA。

16. 配列番号6に示される塩基配列を有する、請求項15に記載のDNA。

17. 配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる、カンジダ・ボイジニ由来プロテイナーゼAの分泌シグナルペプチド。

18. カンジダ・ボイジニSK741株。

19. カンジダ・ボイジニSK741株を、カテプシンCをコードする遺伝子を含む発現ベクターで形質転換し、適当な培地にて培養し、生成したカテプシンCを回収することを含む、カテプシンCの製造方法。

図 1

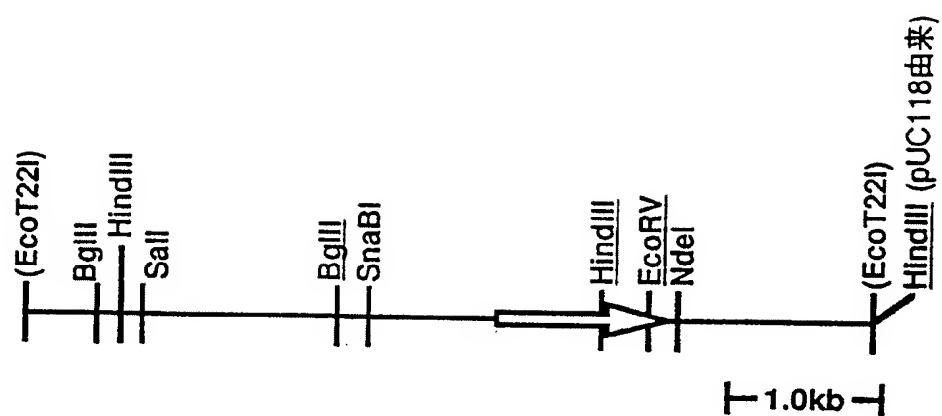


図2

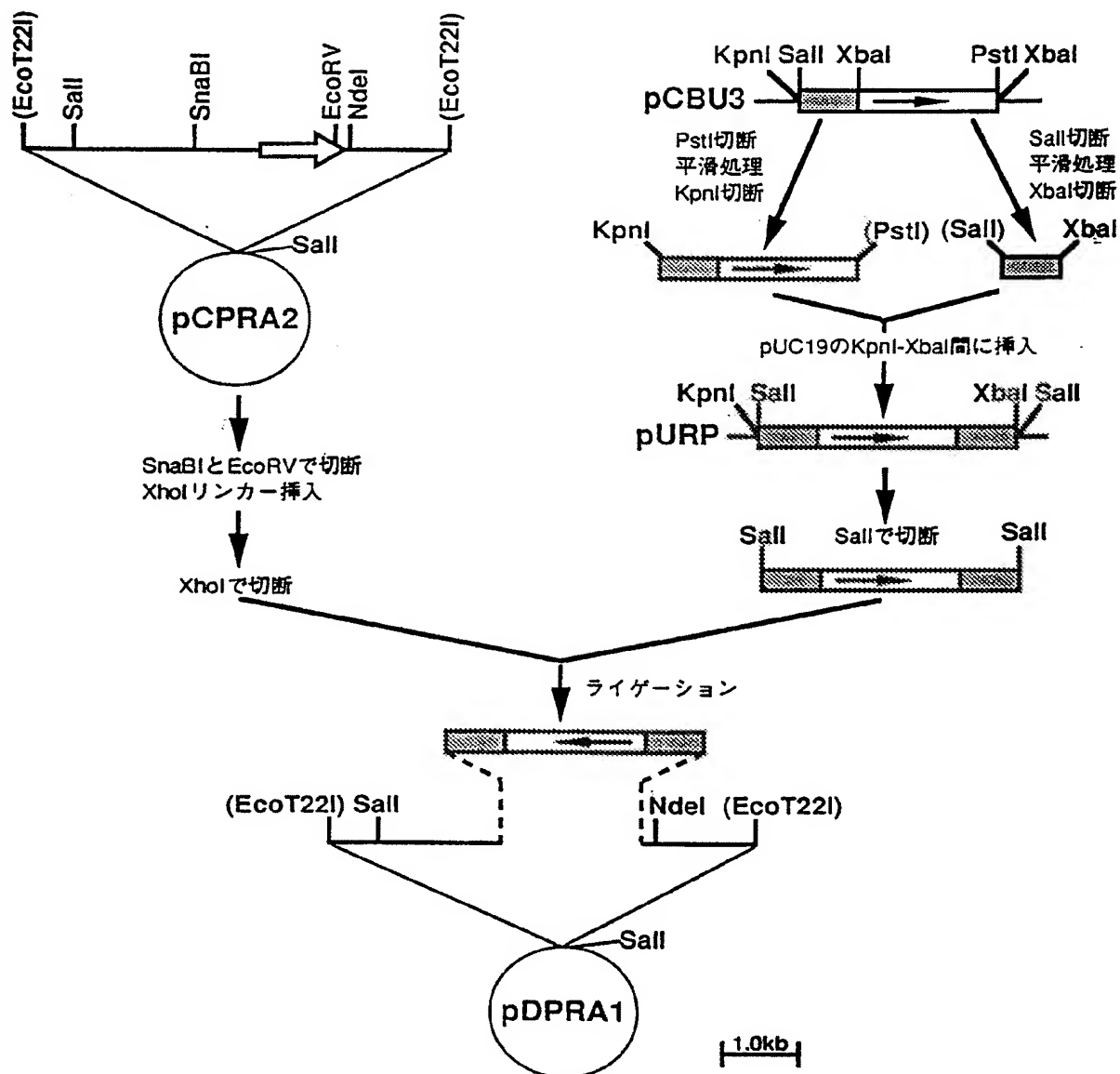




図3

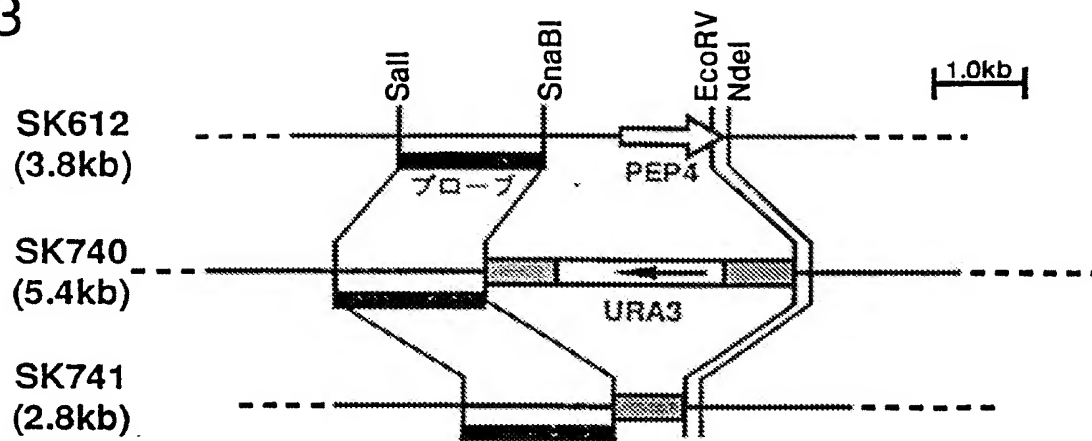


図4

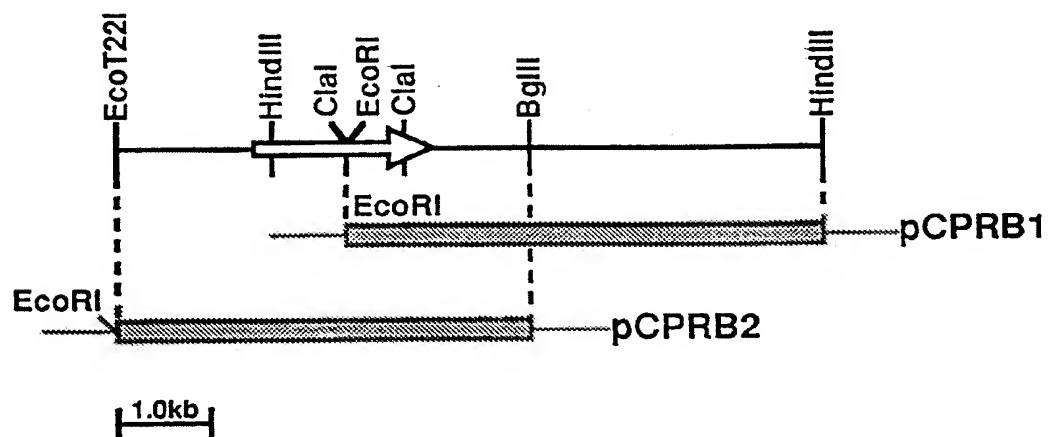


図5

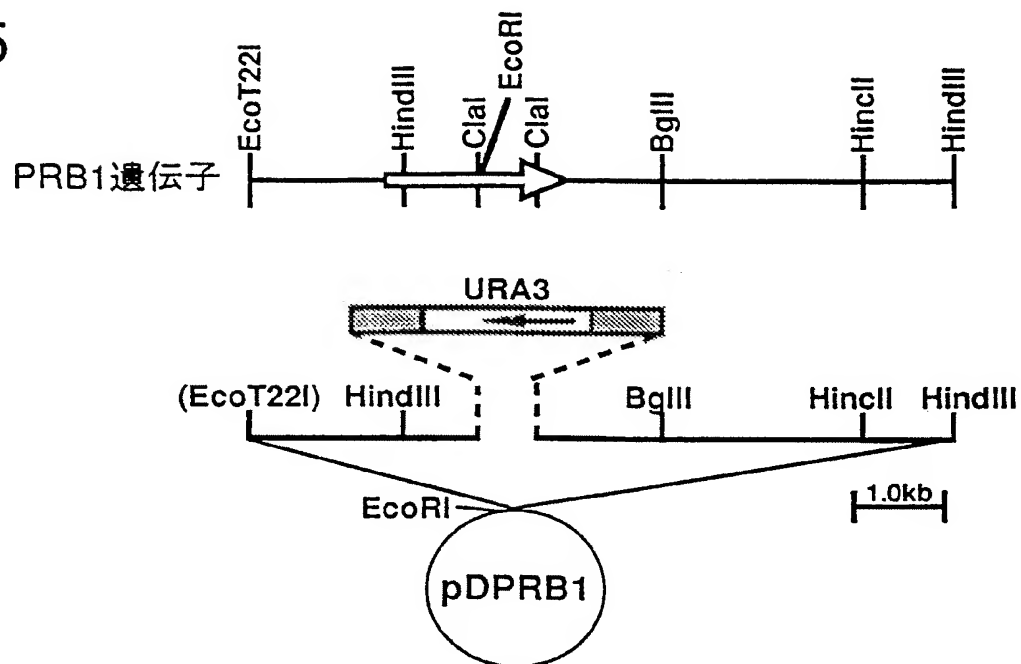


図6

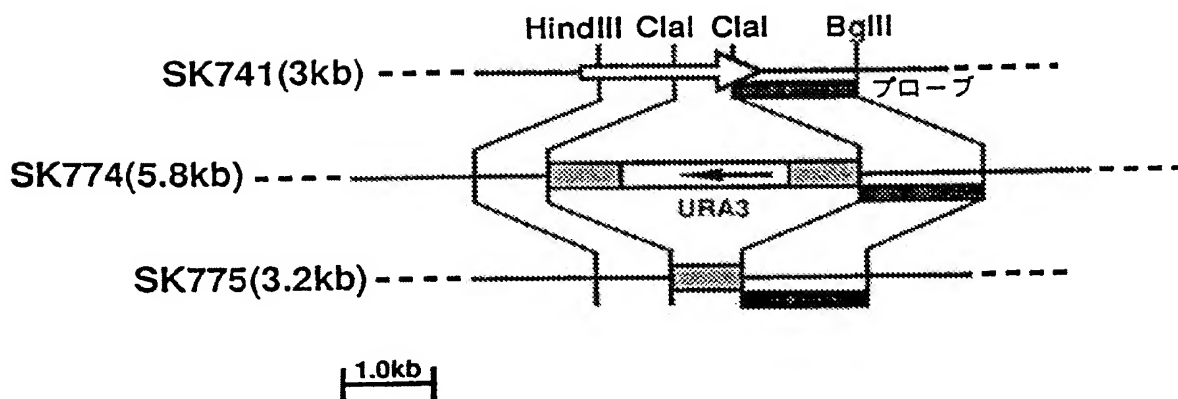


図7

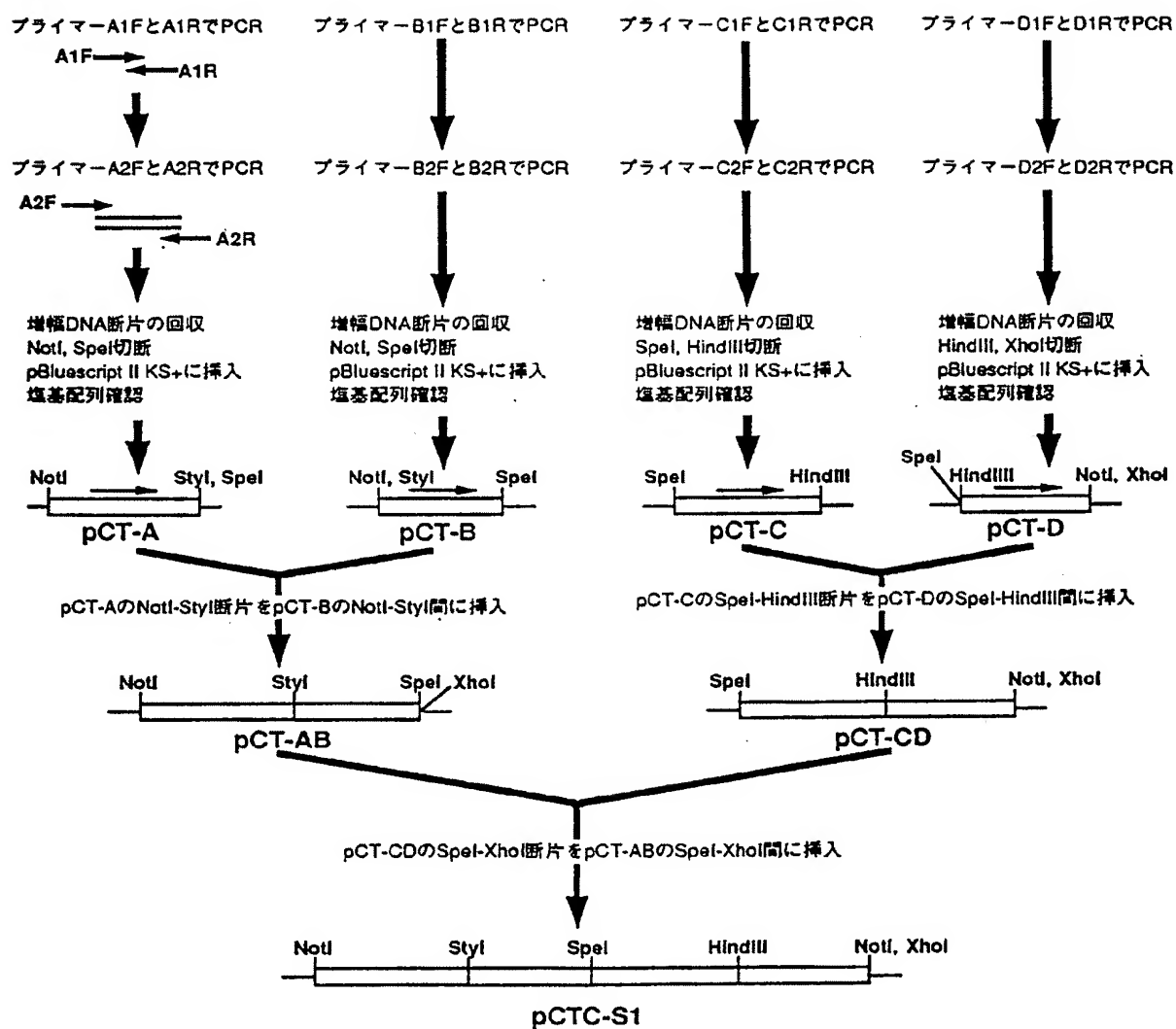


図8

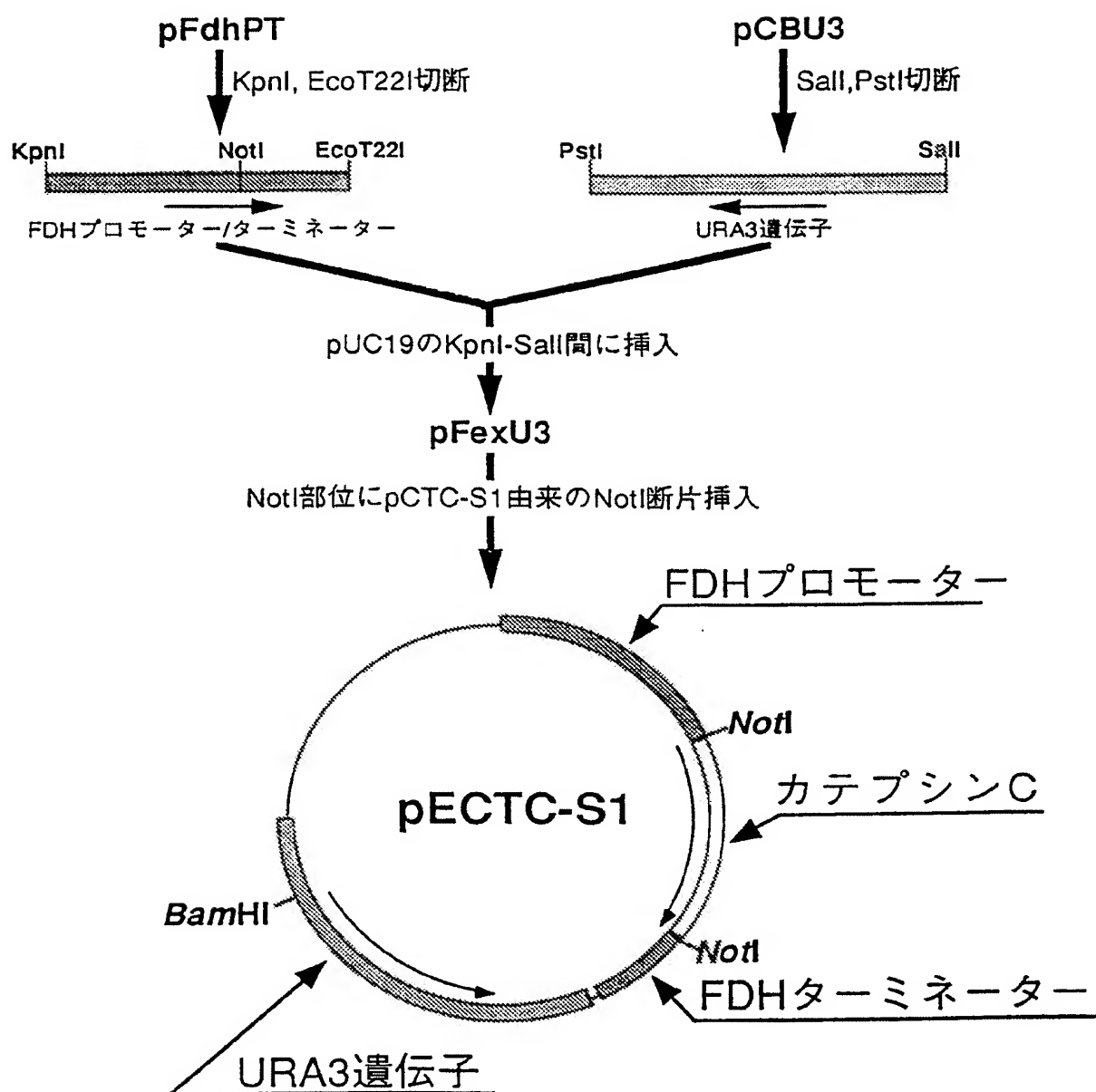
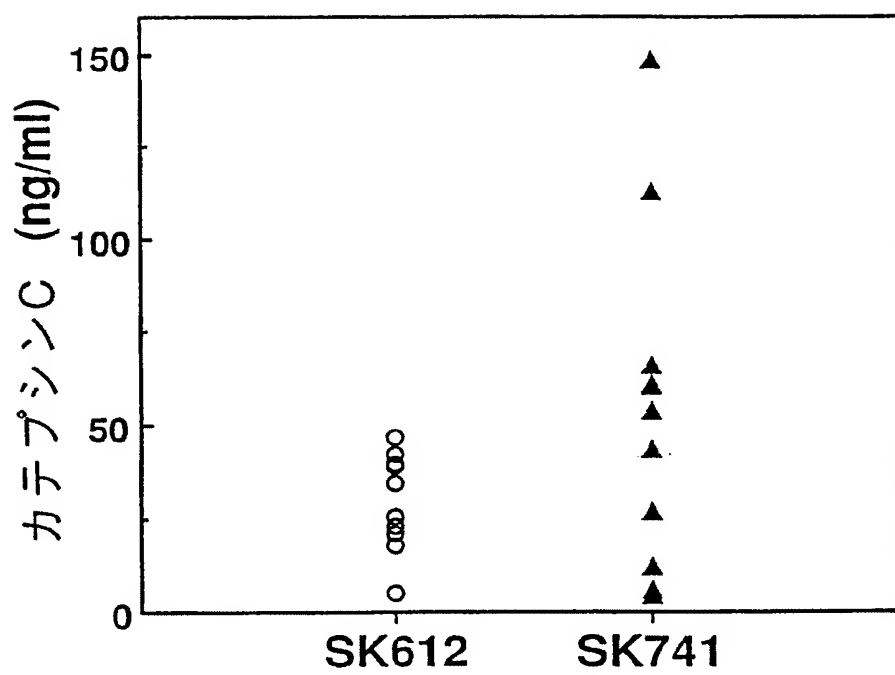


図9



## SEQUENCE LISTING

<110> Kirin Brewery Company, Limited

<120> Candida boidinii strains and use thereof as hosts for preparing  
heterologous proteins

<130> PH-677-PCT

<140>

<141>

<150> JP10-251526

<151> 1998-09-04

<160> 35

<170> PatentIn version 2.0

<210> 1

<211> 3486

<212> DNA

<213> Candida boidinii

<400> 1

agatcttggt atacgcattc ttccgccaac caccaaccac cagccttcca gcaactagcc 60

agcagccagc agcgaggcca aagatgtggc accggcatga aacaatggct gctggtgcgg 120

aaacaactgc ggccagggtca catctcccat tgttttccac gcgctgtttc tgcattgggc 180

cttgtgagaa atacaaatag ggaaagcgat acatacgtaa tgtatgcaat gtatgtaatg 240

tatgcaatta caattgttgc cctctctctt tctacggctc ttctatggc tcttctctct 300

gtatgaacc cactggccct atctctgtcc tctgtgtctc tatctccatc ttcctcttt 360

cctctttcct ctgtctttgt cttatctaca catatcactc ttattcctct tgccttgcttg 420

ctcatccctt gaactgtgcc ctctctccc tctctcttcc tctctcacc ttagtattgt 480

cttgcccaa tgcaaattct aactccattt gcaatcacat tcacatttcc tctccattca 540

actcttcac tttgtctctc ttatcaatta attgattaat caatcacct cctcctatct 600

ttactctc tcccattacc acatcttctt atcagtctgt ctccatcacc ttctccatca 660

aggccattat aaattaacgc ccaacaccat tgccatccat ccccattat catacaacta 720

aagagtattc taatcaatcc atctccgttt gtcatctgtc ttcaatatca cacaagctaa 780

tcaattccct taaagaatta atcctcttaa ttgtattgat agtcatttag cattcaccaa 840

aatttgataa gtatagaatc taagttataa aatataaaat agaacttttc tcgttcaaac 900

atttaaccgc ccatttccct aaaattaaag gtatataaat tacacaaatt caaccattaa 960

aaggaaaaaa aaagaaaaaa actacttctc aaaaagaaat ctttcgcaat gaagttcaca 1020

atcccttttt ctgtcgcttt cagtatctta gctgctacta ccttagttga tgccaaagtt 1080

cactcaattc caattaaaaa acacicttta gaagaaactt ttaaagatat ttctttataat 1140

gattatttag ctctttttaa gaataaatat atctcattat ataacaagca tcactcaaat 1200

aacgccggtg aatctattga aggtgatcaa caacaccctt ttatcccatt cgttgaagtt 1260

gtc gatggtg aattcaaaga ttcaaaaact gatgctcctt taactaacta tatgaatgct 1320

caatatttca cagaaattca attaggtacc ccaggtcaag tctttaaagt tatcttagat 1380

accggttctt ccaatttatg ggtcccaggt aaggattgtt ctcttttagc ttgttactta 1440

cactcaaagt atgatcacga tgaatcgta acttataaga aaaacggtac cgaatttgct 1500

attagatatg gtactgggtc tttagaaggt ttgtctctt ctgatacttt aaccattgga 1560

gatttggtta tcccagatca aggttttgct gaagccactt ctgaaccagg tttaactttt 1620

gcctttggta aattcgatgg tatcttaggt ttagcttatg acactatctc tgtccagaaa 1680

gttgttcctc cagtctataa agccattgat tcaggtttat tagacaaacc acaattttcc 1740

ttctacttag gtgataccgc taaatcagaa actgatggtg gtgttgccac ttttggtggt 1800

atcgatgaat ctaaattcaa cggtaagctt acctggttgc ctgttagaag aaaggcttac 1860



tgggaagttg cattcgatgg tgcggatta ggctctgaat atgctccttt actaaataca 1920

ggtgccgcca ttgatacagg tacctcttta atcgctttac catcaggttt agctgaaatc 1980

ttaaactctg aaattgggtgc cactaaatct tggcttggtc agtacactat cgattgtgcc 2040

gctagagatt ctctaccaga tttaaccttc actttagctg gttacaattt caccattggt 2100

ccttacgatt atactttaga agtttctggt tcttgatctt cttctttcac tccaatggat 2160

atcccagctc caattgggtcc aatggctacc gttgggtgatg cttctttaag aaaattctac 2220

tctgtttacg atttaggtaa agatgctggt ggcttagctc cagctatcta attctgatta 2280

gcttggaag ttattcattt attgcactat tcatatgcgt atataatacc ttctctttct 2340

attgttcaga ctctttttta tacttggtcc attattagct taaatgaaaa ataaatactt 2400

ttttgaaaca aaaaatcatg tttatgatca gttgattttt tgtcttctga ttcttctctc 2460

tattgaacca ttgttataat ttcatTTTTT tcttgatcct tcttttttct ttttttgtc 2520

tcctcttttt aatttttttt ttcggttcgg tttcaaaac aaaaaaaaaac ataattgtaa 2580

aagaatattt ctatatttaa ttatactat attatattag attatattat attttaaatc 2640

aaactaaatt aaataaacta taaataatta taaaagatca ttattgggtga ctttcaggaa 2700

atgcaatatt ataattattt tttcatgaa attgaccgtt actattagat tctccaagag 2760

atacagaatga taattcaacc ctcttgatt tcttaaaagg ttgagaagaa gaaatcaaaa 2820

tatcttgatc tttatcttct tgttetaata actgttgctt tccatcttca ccactcttag 2880

ttgatttact catctcacta tatttctctt ttggtttata accaccgttg tacaaacct 2940

tctttcttct ctggaattc ttattgtgc caccgttgtc accgctacca gaattggcat 3000

tggtattact tctgtaatgc tegtgtgtt tgttattgtt agacacggca gatccaatat 3060

tagaagatgg atttattaca gagctgttaa tattcgataa tatatcacgt agatatttct 3120

tatccatata atcatgcggt tcaatcctga cttcttctcc ttcacgtcg ccagctaaac 3180

cggaagcacc aacatctgca acacgtcgtc ttgatcttt tgtcacattt tgttactgt 3240

tgtaaatact actgctgatg ctactgccat tgctactatt accgatattg ttgtttgact 3300

tattattacc atacttcttt gacttcttct taccatttct gtataaacct gtaccatcgt 3360

taacttcaat cttatatcct aagtagtcca tattattctt atcgataaac aaatgaataa 3420

catctccatc aaaaattctt atcttattec cctttttgat cctattacca ttgacataac 3480

atgcat 3486

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 420

<212> PRT

<213> Candida boidinii

<220>

<221> mat\_peptide

<222> (23)...(420)

<220>

<221> sig\_peptide

<220> (1)...(22)

<400> 2

Met Lys Phe Thr Ile Pro Phe Ser Val Ala Phe Ser Ile Leu Ala Ala

1 5 10 15

Thr Thr Leu Val Asp Ala Lys Val His Ser Ile Pro Ile Lys Lys His

20 25 30

Ser Leu Glu Glu Thr Phe Lys Asp Ile Ser Tyr Asn Asp Tyr Leu Ala

35 40 45

Ser Leu Lys Asn Lys Tyr Ile Ser Leu Tyr Asn Lys His His Ser Asn

50 55 60

Asn Ala Gly Glu Ser Ile Glu Gly Asp Gln Gln His Pro Phe Ile Pro

65 70 75 80

Phe Val Glu Val Val Asp Gly Glu Phe Lys Asp Ser Lys Thr Asp Ala

85 90 95

Pro Leu Thr Asn Tyr Met Asn Ala Gln Tyr Phe Thr Glu Ile Gln Leu  
100 105 110

Gly Thr Pro Gly Gln Val Phe Lys Val Ile Leu Asp Thr Gly Ser Ser  
115 120 125

Asn Leu Trp Val Pro Gly Lys Asp Cys Ser Ser Leu Ala Cys Tyr Leu  
130 135 140

His Ser Lys Tyr Asp His Asp Glu Ser Ser Thr Tyr Lys Lys Asn Gly  
145 150 155 160

Thr Glu Phe Ala Ile Arg Tyr Gly Thr Gly Ser Leu Glu Gly Phe Val  
165 170 175

Ser Ser Asp Thr Leu Thr Ile Gly Asp Leu Val Ile Pro Asp Gln Gly  
180 185 190

Phe Ala Glu Ala Thr Ser Glu Pro Gly Leu Thr Phe Ala Phe Gly Lys  
195 200 205

Phe Asp Gly Ile Leu Gly Leu Ala Tyr Asp Thr Ile Ser Val Gln Lys  
210 215 220

Val Val Pro Pro Val Tyr Lys Ala Ile Asp Ser Gly Leu Leu Asp Lys  
225 230 235 240

Pro Gln Phe Ser Phe Tyr Leu Gly Asp Thr Ala Lys Ser Glu Thr Asp

245 250 255

Gly Gly Val Ala Thr Phe Gly Gly Ile Asp Glu Ser Lys Phe Asn Gly  
260 265 270

Lys Thr Thr Trp Leu Pro Val Arg Arg Lys Ala Tyr Trp Glu Val Ala  
275 280 285

Phe Asp Gly Val Gly Leu Gly Ser Glu Tyr Ala Pro Leu Thr Asn Thr  
290 295 300

Gly Ala Ala Ile Asp Thr Gly Thr Ser Leu Ile Ala Leu Pro Ser Gly  
305 310 315 320

Leu Ala Glu Ile Leu Asn Ser Glu Ile Gly Ala Thr Lys Ser Trp Ser  
325 330 335

Gly Gln Tyr Thr Ile Asp Cys Ala Ala Arg Asp Ser Thr Pro Asp Leu  
340 345 350

Thr Phe Thr Leu Ala Gly Tyr Asn Phe Thr Ile Gly Pro Tyr Asp Tyr  
355 360 365

Thr Leu Glu Val Ser Gly Ser Cys Ile Ser Ser Phe Thr Pro Met Asp  
370 375 380

Ile Pro Ala Pro Ile Gly Pro Met Ala Thr Val Gly Asp Ala Phe Leu  
385 390 395 400

Arg Lys Phe Tyr Ser Val Tyr Asp Leu Gly Lys Asp Ala Val Gly Leu  
 405 410 415

Ala Pro Ala Ile  
 420

<210> 3

<211> 1263

<212> DNA

<213> Candida boidinii

<400> 3

atgaagttca caatcccttt ttctgtcgct ttcagtatct tagctgctac taccttagtt 60  
 gatgccaaag ttcactcaat tccaattaaa aaacactctt tagaagaaac ttttaaagat 120  
 atttcttata atgattatct agcttcttta aagaataaat atatctcatt atataacaag 180  
 catcactcaa ataacgccgg tgaatctatt gaaggatgac aacaacaccc ttttatccca 240  
 ttcgttgaag ttgtcgatgg tgaattcaaa gattcaaaaa ctgatgctcc ttttaactaac 300  
 tatatgaatg ctcaatatct cacagaaatt caattaggta cccaggtca agtcttttaa 360  
 gttatcttag ataccgggtc ttccaattta tgggtcccag gtaaggattg ttcttcttta 420  
 gcttggttact tacactcaaa gtatgatcac gatgaatcgt caacttataa gaaaaacggt 480  
 accgaatttg ctattagata tggtagtggg tctttagaag gttttgtctc ttctgatact 540

ttaaccattg gagatttgg tateccagat caaggttttg ctgaagccac ttctgaacca 600

ggtttaactt ttgcctttgg taaattcgat ggtatcttag gtttagctta tgacactatc 660

tctgtccaga aagttgttcc tccagtctat aaagccattg attcaggttt attagacaaa 720

ccacaatttt ccttctactt aggtgatacc gctaaatcag aaactgatgg tgggtgtgcc 780

acttttgggtg gtatcgatga atctaaattc aacggtaagc ttacctgggt gcctgttaga 840

agaaaggcct actgggaagt tgcattcgat ggtgtcggat taggttctga atatgtcct 900

ttactaaata caggtgccgc cattgataca ggtacctctt taatcgcttt accatcaggt 960

ttagctgaaa tcttaaactc tgaaattgggt gccactaaat cttggtctgg tcagtacact 1020

atcgattgtg ccgctagaga ttctctacca gatttaacct tcactttagc tggttacaat 1080

ttcaccattg gtccttacga ttatacttta gaagtttctg gtcttctgtat ctcttctttc 1140

actccaatgg atatcccagc tccaattgggt ccaatggcta ccgttgggtga tgccttctta 1200

agaaaaattct actctgttta cgatttaggt aaagatgctg ttggtttagc tccagctatc 1260

taa 1263

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Candida boidinii

&lt;400&gt; 4

Met Lys Phe Thr Ile Pro Phe Ser Val Ala Phe Ser Ile Leu Ala Ala

1

5

10

15

Thr Thr Leu Val Asp Ala

20

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 236

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Candida boidinii

&lt;400&gt; 5

Ile Asp Thr Gly Val Ser Val Thr His Glu Glu Phe Asp Gly Arg Ala

1

5

10

15

Lys Trp Gly Lys Thr Ile Pro Thr Asp Asp Ser Asp Val Asp Gly Asn

20

25

30

Gly His Gly Thr His Cys Ala Gly Thr Ile Gly Ser Lys Asp Tyr Gly

35

40

45

Ile Ser Lys Asn Ala Glu Ile Val Ala Val Lys Val Leu Lys Thr Asn

50

55

60

Gly Ser Gly Thr Met Ser Asp Val Val Lys Gly Val Glu Phe Ala Ala





Ile Thr Pro Asp Gln Leu Lys Lys Asn Ile Ile Asp

225

230

235

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 708

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Candida boidinii

&lt;400&gt; 6

atcgatactg gtgttttctgt tacccatgaa gaattcgatg gtagagctaa atggggtaaa 60

accateccaa ctgatgactc tgatgttgat ggtaacggtc acggtactca ctgtgccggt 120

accattgggtt ctaaagatta cggatatctca aagaatgctg aaatcgttgc cgttaaagtc 180

ttaaagacta atggttcagg taccaatgtct gatgtcgtta aagggtttga atttgctgct 240

aacgctcata tcaaggcatt aaaggaatct aaaccgggtt tcaaaggttc tactgccaat 300

atgtcccttag gtgggtggtaa atcaccagct ttagacttag ctgttaatgc tgctgttaaa 360

gctggttttac atttcgccgt tgctgcaggt aatgataacg ctgatgcttg taactattct 420

ccagctgctg ctgaaaaggc tgttaccgtt ggtgcttcaa ctttatctga ttctagagct 480

tacttttcca atttcggtaa atgtgttgat atttttgctc caggttttaa taccittatct 540

acttatattg gttctgattc tgctacagct gttttaagtg gtacttcaat ggcctctcca 600

cacgtttgtg gtttattaac ttatttctta tctttacaac cagaatctga atccttattt 660

tcaactgctg ctattacccc agatcaatta aagaaaaata ttatcgat 708

<210> 7

<211> 1806

<212> DNA

<213> Bovine

<400> 7

gcacgaggcg gctcgtegct ctcttgctgc tcgtctatgg cgctggctcc gtgcgcgggg 60

acacgcctgc caactgcacc taccgccgacc tgctgggcac ctgggtcttc caggtgggct 120

ccagcggctc ccagcgcgat gtcaactgct cggatgatggg acccccagaa aaaaaagtgg 180

tggatgcacct caagaagttg gatacagcat atgatgactt tggcaattcc ggccatttca 240

ccatcattta caatcaaggc ttgagattg tgttgaatga ctacaagtgg ttgcctttt 300

ttaagtataa agaagagggg ggcaaggtaa ccagttactg ccacgagacc atgactggct 360

gggtccatga cgtgctgggc cggaactggg cctgtttcac tggaaggaag acaggaaata 420

cctcggagaa cgtgaacgtg aacacagcac gccttgccggg tctcgaggaa acgtattcta 480

ataggctcta cagatataac catgactttg tgaaagctat caatgccatt cagaagtctt 540

ggactgcagc cccatacatg gaatatgaga ctcttaccct aaaagagatg attaggagag 600

gtggtggcca tagccggaga attccaaggc ccaaacctgc accaatcact gctgaaatac 660

agaaaaagat ttigcatttg ccaacatcct gggattggag aaacgttcat ggtatcaatt 720

ttgttactcc tgttcgaaac caagggcttt giggaagctg ctactcattt gcttctatgg 780

ggatgatgga agcaagaatc cgcatactaa ccaacaacac tcagaccccg atcttgagtc 840

ctcaggaggt tgtgtcttgc agtcagtatg ctcaaggctg tgaagggtgc ttccttacc 900

tcatcgcagg gaagtatgcc caggactttg ggttgggtgga agaggactgt tccccctaca 960

caggcacgga ttgccgtgc agactgaaag agggctgctt ccggtactat tectccgagt 1020

accactacgt gggcgggtttc tacgggggct gcaatgaagc cctgatgaag cttgagctgg 1080

tccatcaggg gcccatggcc gtgcgctttg aagtctacga cgacttcctc cactaccgca 1140

agggcgtcta ccaccacacg gggctgcgag accctttcaa ccccttcgag ctgaccaatc 1200

atgctgtgct gctggtgggc tatggcactg acgcggcctc tggactggat tactggattg 1260

ttaaaaacag ctggggcacc agctgggggtg agaacggtta cttccgcac cgcagaggaa 1320

ccgacgagtg tgcgatcgaa agcatagcgc tggcggccac cccgattcct aagttagtagg 1380

gtgtacctcg cagggtttca cgctgaccac cgccagccag gaagggaaga tgccttattc 1440

agggactgga gacatgtacg gtattgctac tgcagtttca aaagattata gatagcttcc 1500  
 tgtgaagatc tgtgccttta caattaaaag tgcccttgat ttttaatttta atacactttc 1560  
 cccctgaaaa gcagtctgct ttttcctcag tactctgttc agtgcggttt ttatggagga 1620  
 tggtagagaga cgaagtaatg gattttgcta atcattttgt gatccaaacg catgctgtat 1680  
 tttaaaaaca atcgacagaa ccacacaggc ttatttttta attgtataaa tcatgagaca 1740  
 atgtgacaat gggtattaaa aaaattttat aaatattcaa gtgatataaa aaaaaaaaaa 1800  
 aaaaaa 1806

<210> 8

<211> 1377

<212> DNA

<213> Bovine

<400> 8

acg agg cgg ctc gtc gct ctc ttg ctg ctc gtc tat ggc gct ggc tcc 48  
 Thr Arg Arg Leu Val Ala Leu Leu Leu Leu Val Tyr Gly Ala Gly Ser  
 1 5 10 15  
 gtg cgc ggg gac acg cct gcc aac tgc acc tac ccc gac ctg ctg ggc 96  
 Val Arg Gly Asp Thr Pro Ala Asn Cys Thr Tyr Pro Asp Leu Leu Gly  
 20 25 30  
 acc tgg gtc ttc cag gtg ggc tcc agc ggc tcc cag cgc gat gtc aac 144

Thr Trp Val Phe Gln Val Gly Ser Ser Gly Ser Gln Arg Asp Val Asn  
 35 40 45  
 tgc tcg gtg atg gga ccc cca gaa aaa aaa gtg gtg gtg cac ctc aag 192  
 Cys Ser Val Met Gly Pro Pro Glu Lys Lys Val Val Val His Leu Lys  
 50 55 60  
 aag ttg gat aca gca tat gat gac ttt ggc aat tcc ggc cat ttc acc 240  
 Lys Leu Asp Thr Ala Tyr Asp Asp Phe Gly Asn Ser Gly His Phe Thr  
 65 70 75 80  
 atc att tac aat caa ggc ttt gag att gtg ttg aat gac tac aag tgg 288  
 Ile Ile Tyr Asn Gln Gly Phe Glu Ile Val Leu Asn Asp Tyr Lys Trp  
 85 90 95  
 ttc gcc ttt ttt aag tat aaa gaa gag ggt ggc aag gta acc agt tac 336  
 Phe Ala Phe Phe Lys Tyr Lys Glu Glu Gly Gly Lys Val Thr Ser Tyr  
 100 105 110  
 tgc cac gag acc atg act ggc tgg gtc cat gac gtg ctg ggc cgg aac 384  
 Cys His Glu Thr Met Thr Gly Trp Val His Asp Val Leu Gly Arg Asn  
 115 120 125  
 tgg gcc tgt ttc act gga agg aag aca gga aat acc tcg gag aac gtg 432  
 Trp Ala Cys Phe Thr Gly Arg Lys Thr Gly Asn Thr Ser Glu Asn Val  
 130 135 140  
 aac gtg aac aca gca cgc ctt gcg ggt ctc gag gaa acg tat tct aat 480  
 Asn Val Asn Thr Ala Arg Leu Ala Gly Leu Glu Glu Thr Tyr Ser Asn

145	150	155	160
agg ctc tac aga tat aac cat gac ttt gtg aaa gct atc aat gcc att 528			
Arg Leu Tyr Arg Tyr Asn His Asp Phe Val Lys Ala Ile Asn Ala Ile			
	165	170	175
cag aag tct tgg act gca gcc cca tac atg gaa tat gag act ctt acc 576			
Gln Lys Ser Trp Thr Ala Ala Pro Tyr Met Glu Tyr Glu Thr Leu Thr			
	180	185	190
cta aaa gag atg att agg aga ggt ggt ggc cat agc cgg aga att cca 624			
Leu Lys Glu Met Ile Arg Arg Gly Gly Gly His Ser Arg Arg Ile Pro			
	195	200	205
agg ccc aaa cct gca cca atc act gct gaa ata cag aaa aag att ttg 672			
Arg Pro Lys Pro Ala Pro Ile Thr Ala Glu Ile Gln Lys Lys Ile Leu			
	210	215	220
cat ttg cca aca tcc tgg gat tgg aga aac gtt cat ggt atc aat ttt 720			
His Leu Pro Thr Ser Trp Asp Trp Arg Asn Val His Gly Ile Asn Phe			
225	230	235	240
gtt act cct gtt cga aac caa ggg tct tgt gga agc tgc tac tca ttt 768			
Val Thr Pro Val Arg Asn Gln Gly Ser Cys Gly Ser Cys Tyr Ser Phe			
	245	250	255
gct tct atg ggg atg atg gaa gca aga atc cgc ata cta acc aac aac 816			
Ala Ser Met Gly Met Met Glu Ala Arg Ile Arg Ile Leu Thr Asn Asn			
	260	265	270

act cag acc ccg atc ttg agt cct cag gag gtt gtg tct tgc agt cag 864

Thr Gln Thr Pro Ile Leu Ser Pro Gln Glu Val Val Ser Cys Ser Gln

275

280

285

tat gct caa ggc tgt gaa ggt ggc ttc cct tac ctc atc gca ggg aag 912

Tyr Ala Gln Gly Cys Glu Gly Gly Phe Pro Tyr Leu Ile Ala Gly Lys

290

295

300

tat gcc cag gac ttt ggg ttg gtg gaa gag gac tgt ttc ccc tac aca 960

Tyr Ala Gln Asp Phe Gly Leu Val Glu Glu Asp Cys Phe Pro Tyr Thr

305

310

315

320

ggc acg gat tcg ccg tgc aga ctg aaa gag ggc tgc ttc cgg tac tat 1008

Gly Thr Asp Ser Pro Cys Arg Leu Lys Glu Gly Cys Phe Arg Tyr Tyr

325

330

335

tcc tcc gag tac cac tac gtg ggc ggt ttc tac ggg ggc tgc aat gaa 1056

Ser Ser Glu Tyr His Tyr Val Gly Gly Phe Tyr Gly Gly Cys Asn Glu

340

345

350

gcc ctg atg aag ctt gag ctg gtc cat cag ggg ccc atg gcc gtc gcc 1104

Ala Leu Met Lys Leu Glu Leu Val His Gln Gly Pro Met Ala Val Ala

355

360

365

ttt gaa gtc tac gac gac ttc ctc cac tac cgc aag ggc gtc tac cac 1152

Phe Glu Val Tyr Asp Asp Phe Leu His Tyr Arg Lys Gly Val Tyr His

370

375

380



cac acg ggg ctg cga gac cct ttc aac ccc ttc gag ctg acc aat cat 1200  
His Thr Gly Leu Arg Asp Pro Phe Asn Pro Phe Glu Leu Thr Asn His  
385 390 395 400

gct gtg ctg ctg gtg ggc tat ggc act gac gcg gcc tct gga ctg gat 1248  
Ala Val Leu Leu Val Gly Tyr Gly Thr Asp Ala Ala Ser Gly Leu Asp  
405 410 415

tac tgg att gtt aaa aac agc tgg ggc acc agc tgg ggt gag aac ggt 1296  
Tyr Trp Ile Val Lys Asn Ser Trp Gly Thr Ser Trp Gly Glu Asn Gly  
420 425 430

tac ttc cgc atc cgc aga gga acc gac gag tgt gcg atc gaa agc ata 1344  
Tyr Phe Arg Ile Arg Arg Gly Thr Asp Glu Cys Ala Ile Glu Ser Ile  
435 440 445

gcg ctg gcg gcc acc ccg att cct aag ttg tag 1377  
Ala Leu Ala Ala Thr Pro Ile Pro Lys Leu  
450 455

<210> 9

<211> 1402

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designated is a nucleotide sequence encoding a sequence

comprising pre region of proteinase A and pro-mature regions  
of bovine cathepsin C together with NotI recognition sites

at the 5' side of initiation codon (ATG) and at the 3' side of termination codon (TAA) of the structural gene.

<400> 9

gcggccgcat gaagttcaca attccttttt ctgtcgcttt ctctatctta gctgctacta	60
ctttagttag tgctgatact ccagctaatt gtacatatcc agatctatta ggtacttggg	120
tctttcaagt tgggttcttct gggtcacaaa gagatgttaa ttgttctggt atgggtcctc	180
cagagaagaa agttgtcggt cacttaaaga aactgatac tgcttatgat gatttttgta	240
attctgggtca ttctactatt atctataatc aagggttcga aattgtcttg aatgattata	300
aatggtttgc ttcttttaaa tataaagaag aagggtgtaa agttacttct tattgtcatg	360
aaactatgac aggttggggt catgatgtcc taggtagaaa ttgggcttgt ttcactggta	420
gaaagactgg taatacttct gaaaatgtta acgttaatac tgctagatta gctggtttag	480
aagaaacata ctctaataga ttatatcggt ataatcatga ttctgtcaaa gctattaatg	540
ctattcaaaa atcttggact gctgtctcct atatggaata tgaaacatta actcttaaag	600
aaatgattag aagaggtagt ggtcattctc gtagaatacc tagacctaaa cctgcacctt	660
ttactgctga aattcagaag aaaatcttac acttacctac tagttgggat tggagaaatg	720
ttcatgggat taactttgtt actcctgtta gaaatcaagg ttcatgtggt tcttgttact	780

catttgcttc tatgggtatg atggaagcta gaattagaat ttgactaat aatactcaaa 840

ctcctatcct atcctccaaa gaagttgtct ctgttctca atatgctcaa ggttgtgaag 900

gtggtttccc atacttaatt gctggtaa atgctcagga ctttggtcta gttgaagaag 960

attgttttcc atatactggg actgattctc catgtagatt gaaagaagg tgtttcagat 1020

attactcttc tgaatatcat tatgttggtg gtttctatgg tggttgtaat gaagctttga 1080

tgaaattaga attagttcat caaggctcta tggctgttgc ttttgaagtc tatgatgatt 1140

tcttacatta tagaaaagg gtttatcctc acactgggtt aagagatcca tttaatccat 1200

ttgagctcac taatcatgct gtcttattag ttggttatgg tactgatgct gcttctggtt 1260

tagattattg gattgttaag aactcatggg gtacttcttg gggtgaaaat ggttacttta 1320

gaattagaag aggtactgat gaatgtgcta ttgaatctat tgctttagct gctactccta 1380

ttcctaaatt ataagcggcc gc 1402

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 10

Asp Phe Ala Glu Ala Thr Ser Glu Pro Gly Leu

1 5 10

<210> 11

<211> 13

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 11

Pro Tyr Asp Tyr Thr Leu Glu Val Ser Gly Ser Cys Ile

1 5 10

<210> 12

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designated is a nucleotide sequence encoding the amino acid  
sequence of SEQ ID NO:10.

<400> 12

gatttygcwg aagcwacwtc wgaaccwgggt tt 32

<210> 13

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designated is a sequence complementary to a nucleotide sequence  
encoding the amino acid sequence of SEQ ID NO:11.

<400> 13

atacawgawa cttcyaawgt rtaatcrtaw gg 32

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 14

Gly Asn Gly His Gly Thr His Cys Ala Gly Thr

1 5 10

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 15

Ala Thr Ala Val Leu Ser Gly Thr Ser Met Ala

1 5 10

<210> 16

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designated is a nucleotide sequence encoding the amino acid  
sequence of SEQ ID NO:14.

<400> 16

ggtaayggtc ayggtachca ytgchg gw ac 32

<210> 17

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designated is a sequence complementary to a nucleotide sequence  
encoding the amino acid sequence of SEQ ID NO:15.

<400> 17

gccatwgawg tagcwgataa racdgcwgt d gc 32

<210> 18

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 18

caaggctttg agattgtgtt gaatgactac 30

<210> 19

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

tctgagattg ctgctgaaag tctacagtct 30

<210> 20

<211> 126

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Designated is a primer A1F for PCR synthesis of DNA  
represented by SEQ ID NO:9.

<400> 20

gtacatatcc agatctatta ggtacttggg tctttcaagt tggttcttct ggttcacaaa 60  
  
gagatgttaa ttgttctgtt atgggtcctc cagagaagaa agttgtcgtt cacttaaaga 120  
  
aacttg 126

<210> 21

<211> 126

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Designated is a primer A1R for PCR synthesis of DNA  
represented by SEQ ID NO:9.

<400> 21

gcaaaccatt tataatcatt caagacaatt tcgaaacctt gattatagat aatagtgaag 60

tgaccagaat taccaaaatc atcataagca gatatcaagtt tctttaagtg aacgacaact 120

ttcttc 126

<210> 22

<211> 125

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Designated is a primer A2F for PCR synthesis of DNA  
represented by SEQ ID NO:9.

<400> 22

ggggggcggc cgcatgaagt tcacaattcc ttttctgtc gctttctcta tcttagctgc 60

tactacttta gttgatgctg atactccagc taattgtaca tatccagatc tattaggtac 120

ttggg 125

<210> 23

<211> 128

<212> DNA



<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Designated is a primer A2R for PCR synthesis of DNA  
represented by SEQ ID NO:9.

<400> 23

ccccactag tcctaggaca tcatgaaccc aacctgtcat agtttcatga caataagaag 60

taactttacc accttcttct ttatatTTaa agaaagcaaa ccatttataa tcattcaaga 120

caatttcg 128

<210> 24

<211> 118

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Designated is a primer B1F for PCR synthesis of DNA  
represented by SEQ ID NO:9.

<400> 24

cgTTaatact gctagattag ctggTTtaga agaaacatac tctaatagat tatatcgTTa 60

taatcatgat ttcgTcaaag ctattaatgc tattcaaaaa tcttggac 118

<210> 25

<211> 107

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Designated is a primer B1R for PCR synthesis of DNA  
represented by SEQ ID NO:9.

<400> 25

tacgagaatg accaccacct cttctaataca ttctttaag agttaatggt tcatattcca 60

tataaggagc agcagtccaa gatTTTTgaa tagcattaat agctttg 107

<210> 26

<211> 112

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Designated is a primer B2F for PCR synthesis of DNA  
represented by SEQ ID NO:9.

<400> 26

ggggggcggc cgcggggcct aggtagaaat tgggcttggt tcaactggtag aaagactggt 60

aatacttctg aaaatgttaa cgtaatact gctagattag ctggtttaga ag 112

<210> 27

<211> 106

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Designated is a primer B2R for PCR synthesis of DNA  
represented by SEQ ID NO:9.

<400> 27

ccccactag taggtaagtg taagattttc ttctgaattt cagcagtaat aggtgcaggt 60

ttaggtctag gtattctacg agaatgacca ccacctcttc taatca 106

<210> 28

<211> 120

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Designated is a primer C1F for PCR synthesis of DNA  
represented by SEQ ID NO:9.

<400> 28

ttgcttctat gggtatgatg gaagctagaa ttagaatttt gactaataat actcaaactc 60

ctatcttate tccacaagaa gtigtctctt gtctcaata tgctcaaggt tgtgaagggt 120

<210> 29

<211> 120

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Designated is a primer C1R for PCR synthesis of DNA  
represented by SEQ ID NO:9.

<400> 29

atggagaatc agtaccagta tatggaaaac aatcttcttc aactagacca aagtcctgag 60

catatttacc agcaattaag tatgggaaac caccttcaca accttgagca tattgagaac 120

<210> 30

<211> 133

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Designated is a primer C2F for PCR synthesis of DNA  
represented by SEQ ID NO:9.

<400> 30

gggggactag ttgggattgg agaaatgttc atggtattaa ctltgttact cctgtagaa 60

atcaagggtc atgtggttct tgttactcat ttgcttctat gggatatgatg gaagctagaa 120

ttagaatttt gac 133

<210> 31

<211> 119

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Designated is a primer C2R for PCR synthesis of DNA  
represented by SEQ ID NO:9.

<400> 31

cccccaagct tcattacaac caccatagaa accaccaaca taatgatatt cagaagagta 60

atatctgaaa caaccttctt tcaatctaca tggagaatca gtaccagtat atggaaaac 119

<210> 32

<211> 111

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Designated is a primer D1F for PCR synthesis of DNA  
represented by SEQ ID NO:9.

<400> 32

attatagaaa aggtgtttat catcacactg gttaaagaga tccatttaat ccatttgagc 60

tcactaatca tgctgtctta ttagttgggt atgggtactga tgctgcttct g 111

<210> 33

<211> 114

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Designated is a primer D1R for PCR synthesis of DNA  
represented by SEQ ID NO:9.

<400> 33

gtacctcttc taattctaaa gtaaccattt tcacccaag aagtaccca tgagttctta 60

acaatccaat aatctaaacc agaagcagca tcagtacat aaccaactaa taag 114

<210> 34

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Designated is a primer D2F for PCR synthesis of DNA  
represented by SEQ ID NO:9.

<400> 34

gggggaagct ttgatgaaat tagaattagt tcatcaaggt cctatggctg ttgcttttga 60

agtctatgat gatttcttac attatagaaa aggtgtttat catcacactg 110

<210> 35

<211>

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Designated is a primer D2R for PCR synthesis of DNA  
represented by SEQ ID NO:9.

<400> 35

ccccctcga ggcgccgct tataatttag gaataggagt agcagctaaa gcaatagatt 60

caatagcaca ttcattcagta cctcttctaa ttctaaagta accattttc 109

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04802

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/81, 1/16, C07K14/40, 7/06, 7/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/00, 1/16, C07K14/40, 7/06, 7/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CA (STN), BIOSIS (DIALOG), WPIDS (STN), GenBank, EMBL, DDBJ,  
SwissProt, PIR, Geneseq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 7-508166, A (Rhone-Poulenc Rorer S.A.), 14 September, 1995 (14.09.95), Full text & WO, 94/579, A1 & FR, 2692907, A1 & EP, 672150, A1 & US, 5679544, A	1-19
A	MICHEL Monod et al., "Multiple of genes encoding secreted aspartic proteinases in Candida species, Mol. Microbiol., Vol. 13(2), pages 357-368 (1994)	1-19
A	von Heijne, G et al., "A new method for predicting signal sequence cleavage sites", Nucl. Acids Res., Vol. 14, pages 4683-4690 (1986)	17

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	---

Date of the actual completion of the international search 29 November, 1999 (29.11.99)	Date of mailing of the international search report 07 December, 1999 (07.12.99)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office  Facsimile No.	Authorized officer  Telephone No.



## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/04802

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/81, 1/16, C07K14/40, 7/06, 7/08

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/00, 1/16, C07K14/40, 7/06, 7/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), BIOSIS (DIALOG), WPIDS (STN), GenBank, EMBL, DDBJ, SwissProt, PIR, Geneseq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 7-508166, A (ローン・ブーラン・ロレ・ソシエ・アノニム), 14. 9月. 1995 (14. 09. 95), 文献全体参照, & WO, 94/579, A1 & FR, 2692907, A1 & EP, 672150, A1 & US, 5679544, A	1-19
A	MICHEL Monod et al., "Multiple of genes encoding secreted aspartic protei nawes in Candida species" Mol. Microbiol., Vol. 13 (2), p. 357-368 (1994)	1-19
A	von Heijne, G et al., "A new method for predicting signal sequence cleavag e sites" Nucl. Acids Res., Vol. 14, p. 4683-4690 (1986)	17

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29. 11. 99

国際調査報告の発送日

07.12.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

坂崎 恵美子 印

4 N

9 4 5 1

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

$$\mathbb{R}^x$$

$$\mathbb{R}^y$$

$$\mathbb{R}^z$$

$$\mathbb{R}^{z-1}$$

$$\mathbb{R}^{z-1}$$

$$\mathbb{R}''$$